

明細書

新規ブレビバチルス・チョウシネンシス及び該微生物を宿主とするタンパク質の
製造方法

技術分野

本発明は、新規なブレビバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*) に関する。より具体的には、本発明は、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が格段に低減し、また、胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシスに関する。また該ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いた遺伝子組換えによるタンパク質製造方法に関する。

背景技術

遺伝子組換え技術は、生体内に微量しか存在せず単離が難しいために従来は利用が著しく困難であったタンパク質、または、任意のアミノ酸配列を有するポリペプチドを、細菌または動物細胞などを宿主に用いて大量に生産することを可能にした。遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主には様々な細菌が用いられているが、最も広く用いられている細菌は大腸菌である。しかしながら、大腸菌を宿主とする組換えタンパク質生産系では、生産されたタンパク質が菌体内に蓄積されるため、細胞の容積が生産されたタンパク質の量の上限となってしまい、タンパク質の大量生産が難しい。また更に、細胞内に蓄積されたタンパク質を回収するために大腸菌菌体を破碎する必要があることや、大腸菌菌体の破碎物に含まれる菌体由来の成分である核酸、目的以外のタンパク質及び菌体の細胞壁に由来するエンドトキシン等から目的とするタンパク質を分離回収する操作が煩雑になるなどの問題がある。

大腸菌の系が持つこれらの問題を回避するため、タンパク質を分泌生産する能力を有する代表的な細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を宿主に用いた組換えタンパク質の生産系の開発が行われた。この枯草菌を宿主に用いた生産系では、生産された組換えタンパク質は培地中に分泌生産される。そのため、この枯

草菌の系には、タンパク質を回収するための菌体破碎が不要であることやエンドトキシンがほとんど生じないことなどの大腸菌の系にはない優れた性質がある。

ところが、一方で、枯草菌にはタンパク質分解酵素を大量に細胞外に分泌するという性質があるため、分泌生産された組換えタンパク質が、タンパク質分解酵素により分解されてしまい、組換えタンパク質の収量が極めて少なくなるという大きな問題があった。そのため、枯草菌のタンパク質分解酵素の產生を低減するための様々な努力が行われてきた。しかし、それにもかかわらず、枯草菌を宿主とする組換えタンパク質生産系が異種タンパク質の産業的な生産に用いられた例は、これまでほとんど知られていない。

一方で、枯草菌の系が持つこの問題を回避するために、組換えタンパク質を細胞外に分泌生産するが、細胞外にタンパク質分解酵素を分泌しない細菌を宿主に用いた新たな組換えタンパク質生産系の開発が行われた。そして、その結果、枯草菌よりタンパク質分解酵素活性が弱く、なおかつ、枯草菌より優れたタンパク質の分泌生産性を示すバチルス・プレビス 47 (*Bacillus brevis* 47) (特許文献1) を初めとするバチルス・プレビス (*Bacillus brevis*) を宿主とする組換えタンパク質の生産系の開発に成功した。

なお、現在、バチルス・プレビス (*Bacillus brevis*) は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果、ブレビバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*)、ブレビバチルス・プレビス (*Brevibacillus brevis*) などからなるブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属細菌に再分類されている (非特許文献1)。

しかしながら、バチルス・プレビス 47 にも細胞外に微弱なタンパク質分解活性が存在していることがわかった。バチルス・プレビスを宿主とする組換えタンパク質生産においては比較的長時間 (通常 3 日間程度) の培養が必要とされている。そのため、たとえバチルス・プレビス菌体の細胞外のタンパク質分解活性が微弱なものであっても、生産された組換えタンパク質が細胞外のタンパク質分解活性により分解されてしまい組換えタンパク質の収量が減少する場合があった。この問題の解決のために、これまでにもバチルス・プレビスの細胞外のタンパク質分解活性を更に低減させるための努力が行われてきた。

例えば、バチルス・ブレビス菌株のスクリーニングが広い範囲で行われ、細胞外のタンパク質分解活性が著しく低く、なおかつ、タンパク質の分泌生産性にも優れた菌株としてブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (Brevibacillus choshinensis HPD31) (FERM BP-1087) (FERM BP-6863:バチルス・ブレビス H102 (Bacillus brevis H102) (特許文献2) と同一株) や、その変異株であるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5 (Brevibacillus choshinensis HPD31-S5) (FERM BP-6623:本菌株はBacillus brevis HPD31-S5の表示で寄託された。) が分離された。そして、これらの菌株はヒト上皮細胞増殖因子 (hEGF) を初めとする様々な組換えタンパク質の生産において宿主として利用されている。例えば、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31によるhEGFの生産に関しては、非特許文献2 (同文献においてブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31はBacillus brevis HPD31と記載されている。) 他に示されている。

ところが、このブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びHPD31-S5においても、鋭敏なタンパク質分解活性の検出法を用いた場合には細胞外のタンパク質分解活性が検出されている。たとえば、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD-31の培養上清に対してゼラチント PAGE (ザイモグラフ) 法によるタンパク質分解活性の検出を行った結果では、図2に示されているようにゼラチンの分解によるバンドが確認されている。

一方、タンパク質分解酵素活性 (タンパク質分解活性) を実質的に示さない変異バチルス・ブレビス菌株と称されるバチルス・ブレビス31-OK株も開示されている (特許文献3)。しかしながら、このバチルス・ブレビス31-OKにおいても、ゼラチント PAGE 法によるタンパク質分解活性の評価試験の結果では、タンパク質分解活性が残存していることを示すバンドが確認でき、完全に細胞外のタンパク質分解活性が失われているわけではなかった。しかも、この細胞外のタンパク質分解活性についての遺伝子レベルでの解明は全くなされていなかった。すなわち、タンパク質分解酵素の単離は行われておらず、ましてや、その遺伝子の配列決定はおろか、クローニングさえ行われていなかった。

したがって、これらの細胞外のタンパク質分解活性が低減されたとされる菌株

を用いた場合においても、菌株に残存する細胞外タンパク質分解活性により分泌生産されたタンパク質が分解され、その収量が減少する可能性があった。

また、これらのプレビバチルス・チョウシネンシス（もしくはバチルス・プレビス）は、スクリーニングもしくは変異剤処理等による突然変異により得られたものであり、そのゲノム上のタンパク質分解酵素遺伝子を同定し、更に、該遺伝子の不活性化を行うことにより得られたものではなかった。したがって、そのゲノム上のタンパク質分解酵素遺伝子を同定し、更に、該遺伝子の不活性化を行うことによりタンパク質分解活性の低減を行ったプレビバチルス・チョウシネンシスはこれまで知られていなかった。

また、上記のプレビバチルス・チョウシネンシスのタンパク質分解活性の低減は、全て細胞外タンパク質分解活性の低減を目的としており、細胞内のタンパク質分解活性の低減には注意が払われていなかった。ところが、プレビバチルス・チョウシネンシスを宿主とする組換えタンパク質生産において、目的とするタンパク質の種類によっては、分泌生産はできないが細胞内への蓄積生産であれば可能である場合がある。その場合、生産されたタンパク質によっては細胞内のタンパク質分解酵素の作用により分解されてしまい、組換えタンパク質がほとんど得られない場合があった。

また、プレビバチルス・チョウシネンシスは、培養中に一部の菌体の溶菌が起り、その結果、培地中に細胞内タンパク質分解酵素を含むその細胞内のタンパク質が溶出することが知られている。そのため、細胞外に分泌生産された組換えタンパク質であっても、その溶出した細胞内タンパク質分解酵素により分解されてしまう可能性があった。

したがって、細胞内のタンパク質分解活性を低減することもまた、遺伝子組換え宿主としてのプレビバチルス・チョウシネンシスの有用性をより高めるために解決すべき課題のひとつであった。

なお、これまで、プレビバチルス・チョウシネンシスの細胞内のタンパク質分解活性の低減化を行った例は、全く知られていない。

また、プレビバチルス・チョウシネンシスの細胞内のタンパク質分解活性に関する遺伝子レベルでの解明も、これまで全く行われていない。すなわち、これま

でブレビバチルス・チョウシネンシスの細胞内タンパク質分解酵素の単離を行った例は、全く知られていない。また、細胞内タンパク質分解酵素遺伝子のクローニング及び配列決定を行った例についても全く知られていない。

更に、ブレビバチルス・チョウシネンシスを遺伝子組換え宿主として、より広範な産業上の用途に利用可能にするためには、上記のタンパク質分解活性の低減とは別の問題を解決する必要があった。

ブレビバチルス・チョウシネンシスは、枯草菌などのバチルス属細菌と同様に胞子体を形成する場合がある。胞子体は生細胞（非胞子菌体）に比べて耐熱性が高く、かなり厳しい殺菌条件が要求される。そのため、特に、培養終了後に製造ライン内の胞子体を含めた菌体の完全な滅菌・除去の保証が求められる組換えタンパク質医薬品の製造において、ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いて、その製造を行うためには、かなり難しい技術が要求された。

したがって、組換えタンパク質医薬品の製造を初めとする広範な産業上の用途においてブレビバチルス・チョウシネンシスを組換え宿主として利用可能にするために、胞子体を形成せず、おだやかな殺菌条件（60°Cから100°C）でも完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシス菌株が要望されていた。

なお、ブレビバチルス・チョウシネンシスの胞子体の殺菌に必要とされる条件は、枯草菌の胞子体の殺菌に求められる条件よりはるかに弱い。たとえば、100°Cでの枯草菌の胞子体のD値（生細胞（非胞子菌体）及び胞子体を含むすべての菌数を1/10に減少させる、各温度域での時間）は菌株によって差があるものの11分程度とされている。一方、ブレビバチルス・チョウシネンシスの胞子体では1分以下である。しかしながら、それでも、ブレビバチルス・チョウシネンシスの胞子体の殺菌には、その生細胞（非胞子菌体）の殺菌に比べてかなり厳しい条件が必要になる。たとえば、後述の実施例に示すように、80°Cでのブレビバチルス・チョウシネンシスの生細胞（非胞子菌体）のD値は1分未満であるが、胞子体のD値は6.7分程度である。

枯草菌においては無胞子性菌株としてバシラス・サチリスSMS275（特許文献4：特開平4-287686）などが開示されている。しかしながらブレビバチルス・チョウシネンシスにおいては、これまで胞子形成能を有しない菌株、

すなわち、おだやかな殺菌条件でも完全に死滅する菌株は知られていなかった。

特許文献1

特開昭60-58074号公報

非特許文献1

Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 939-946 (1996)

特許文献2

特開昭63-56277号公報

非特許文献2

Ann. NY Acad. Sci., 782, 115-122 (1996)

特許文献3

特開平6-296485号公報

特許文献4

特開平4-287686号公報

発明が解決しようとする課題

前記のように、プレビバチルス・チョウシネンシスは、遺伝子組換えの宿主として極めて優れた特性を有しているが、遺伝子組換えの宿主として、より一層、その産業上の有用性を高めるためには解決すべき課題がいくつかあった。

それは、細胞外のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したプレビバチルス・チョウシネンシスを得ること。また、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したプレビバチルス・チョウシネンシスを得ること。また更には、胞子体を形成せず、したがって、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するプレビバチルス・チョウシネンシスを得ることである。

したがって、本発明は、細胞外のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の分泌生産効率が向上したプレビバチルス・チョウシネンシス。また、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産効率が向上し

たブレビバチルス・チョウシネンシス。胞子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシス。また更には、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の生産効率が向上し、なおかつ、胞子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシスを提供することを目的とする。なお本発明において「細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減する」には該活性が完全に消失することも包含する。

また更に、本発明は、該ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主として利用した遺伝子組換えによるタンパク質製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明者らは、まず胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスを得るために、組換えタンパク質生産の宿主として実績のあるブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 を親株に、変異剤処理による突然変異株の取得を試みた。

まず、コロニーの形態の変化を指標にして変異が起きた株を選択することとし、通常のブレビバチルス・チョウシネンシスのコロニーの形態と異なりシワを有しないコロニーを形成した菌株を選択した。更に、これらの菌株の内から顕微鏡観察で胞子が確認できないものを、胞子形成能を有しない可能性がある菌株として選択した。更に、これらの胞子形成能を有しない可能性がある菌株に対して胞子形成能の評価試験を行い、胞子形成能を有しない菌株を選択した。そして、更に、この菌株を宿主に用いた組換えタンパク質の生産性の評価試験を行い、遺伝子組換えの宿主に利用されている公知の菌株であるブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 と同等の組換えタンパク質の生産性を有している変異株を選択した。

以上により、本発明者らは、胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスを得た。

本発明者らは、更に、細胞外及び細胞内のタンパク質分解酵素活性が、公知の菌株より格段に低減されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株を得るために、前記の胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシス菌株を親株に用

いて、更に、細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活性を行った。本発明者らは、まず、不活性の対象となるタンパク質分解酵素遺伝子を同定するために、タンパク質分解酵素遺伝子のクローニングを試みた。その結果、本発明者らは2種類の新規のタンパク質分解酵素、すなわち、細胞内主要タンパク質分解酵素であるIMPと細胞外主要タンパク質分解酵素であるEMPの遺伝子のクローニングに成功し、更に、これらの遺伝子を不活性化したプレビバチルス・チョウシネンシスを作製した。

なお、本発明者らは、プレビバチルス・チョウシネンシスのゲノム上の特定のタンパク質分解酵素遺伝子の不活性化を、公知の相同組換えに準じた方法により行ったが、その際、後述のとおり、各遺伝子の不活性化毎に薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子がゲノム上に残されることになる。そのため多重の遺伝子不活性化を行うには、遺伝子不活性化の都度、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子をゲノム上から削除する必要がある。本発明者らは、そのマーカー遺伝子の削除に、FRT配列と酵母由来のF1pリコンビナーゼ遺伝子からなる系を利用した。更に、その際、後述の実施例に示すように、F1pリコンビナーゼ遺伝子を有し、かつ、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合にはプレビバチルス・チョウシネンシスの菌体から容易に脱落するプラスミドDNAを新規に構築し、これを用いた。このプラスミドは、菌体内に導入しゲノム上に残されたマーカー遺伝子を削除した後、ネオマイシンを含まない培地で培養を行うことにより菌体から容易に脱落させることができる。このプラスミドを用いることにより多重遺伝子不活性化が可能になった。

更に、本発明者らは、このようにして得た細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子を不活性化したプレビバチルス・チョウシネンシス菌株について胞子形成能及びタンパク質分解活性の評価を行った。その結果、該菌株が胞子形成能を有していないこと、また、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株であるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31より格段に低減したことを確認した。

また更に、このプレビバチルス・チョウシネンシス菌株を遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主に用いて、他の公知のプレビバチルス・チョウシネンシス

菌株を宿主に用いた場合には分泌生産後に分解を受けることが確認されているタンパク質の生産を行った。その結果、タンパク質の蓄積量が、公知の菌株であるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べて増加していることを確認し、本発明を完成させた。

以上により、本発明は、細胞外タンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の分泌生産効率が向上したブレビバチルス・チョウシネンシス、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産効率が向上したブレビバチルス・チョウシネンシス、及び胞子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。また更には、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減されたことにより、組換えタンパク質の生産効率が向上し、なおかつ、胞子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。

また更に、本発明は、該ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主として利用した遺伝子組換えによるタンパク質製造方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1

本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスの作製に用いた相同組み換えによる遺伝子不活性化法の概略を示す図である。

図2

ゼラチン-PAGE（ザイモグラフ）により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31（レーン1）、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3（レーン2）の培養上清画分のタンパク質分解酵素活性を測定した結果を示す図面である。なお、白枠内は、タンパク質分解酵素活性によってゼラチンが分解したために生じたクリアバンドを示す。

図3

未変性条件下でのゼラチン-PAGE（ザイモグラフ）により、ブレビバチル

ス・ショウシネンシスHPD31（レーン1）、プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3（レーン2）の細胞内画分のタンパク質分解酵素活性を測定した結果を示す図面である。なお、白枠内は、タンパク質分解酵素活性によってゼラチンが分解したために生じたクリアバンドを示す。

図4

プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31及びプレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3を宿主として用いた遺伝子組換えにより分泌生産されたブタIL-1 β に対するCBB染色の結果を示す図面であって、ブタIL-1 β の分泌生産および分解を示す図面である。なお、レーン1は遺伝子組換え体プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31/pNY301-pIL-1 β を示し、レーン2は遺伝子組換え体プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3/pNY301-pIL-1 β を示す。

図5

プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31及びプレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3を宿主として用いた遺伝子組換えにより分泌生産されたブタIL-1 β に対する抗ブタIL-1 β 抗体によるウエスタンプロットの結果を示す図面であって、ブタIL-1 β の分泌生産および分解を示す図面である。なお、レーン1は遺伝子組換え体プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31/pNY301-pIL-1 β を示し、レーン2は遺伝子組換え体プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3/pNY301-pIL-1 β を示す。

図6

プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31及びプレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3を宿主として用いた遺伝子組換えにより、細胞内に蓄積生産されたブタIFN- γ に対する抗ブタIFN- γ 抗体によるウエスタンプロットの結果を示す図面であって、ブタIL-1 γ の細胞内への蓄積生産と分解を示す図面である。なお、レーン1は遺伝子組換え体プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31/pNY301を示し、レーン2は遺伝子組換え体プレビバチルス・ショウシネンシスHPD31-SP3/pNY301-pINF- γ を示し、

レーン 3 は遺伝子組換え体プレビバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 - S P 3 / p N Y 3 0 1 - p I F N - γ を示す。

図 7

胞子形成関連遺伝子 h o s のDNA塩基配列（上段）及びそれに対応するアミノ酸配列（下段）を示す。

図 8

同上続きを示す。

図 9

細胞外タンパク質分解酵素 EMP のアミノ酸配列（下段）及びそれをコードする遺伝子 e m p のDNA配列（上段）を示す。

図 10

同上続きを示す。

図 11

同上続きを示す。

図 12

細胞内タンパク質分解酵素 IMP のアミノ酸配列（下段）及びそれをコードする遺伝子 i m p のDNA配列（上段）を示す。

図 13

同上続きを示す。

図 14

プライマー H o s P 1、H o s P 2、H o s P 3、H o s P 4 を示す。

図 15

プライマー i m p P 1、i m p P 2 を示す。

図 16

プライマー f 1 p P 1 を示す。

図 17

プライマー f 1 p P 2 を示す。

図 18

プライマー f 1 p P 3 を示す。

図19

プライマー f 1 p P 4 を示す。

図20

プライマー f 1 p P 5 を示す。

図21

プライマー f 1 p P 6 を示す。

図22

プライマー f 1 p P 7 を示す。

図23

プライマー f 1 p P 8 を示す。

図24

プライマー e mp P 1、e mp P 2 の塩基配列及びアミノ酸配列データを示す。

図25

プライマー e mp P 3、e mp P 4、アダプタープライマーを示す。

図26

実施例19におけるセンスプライマーを示す。

図27

同アンチセンスプライマーを示す。

図28

実施例20におけるセンスプライマーを示す。

図29

同アンチプライマーを示す。

図30

実施例21におけるセンスプライマーを示す。

図31

同アンチセンスプライマーを示す。

図32

実施例23におけるセンスプライマーを示す。

図3 3

同アンチセンスプライマーを示す。

図3 4

実施例24におけるセンスプライマーを示す。

図3 5

同アンチセンスプライマーを示す。

図3 6

実施例25におけるセンスプライマーを示す。

図3 7

同アンチセンスプライマーを示す。

以下、本発明について詳述する。

本発明は、下記の(1)～(16)を実施態様の例として包含するものである。

- (1) 胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。
- (2) 下記の菌学的性質を有し、胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

(a) 形態

細胞の大きさ

液体培地: 0. 4～0. 6 × 1. 5～4 μ m

細胞の形	桿菌
------	----

胞子の有無	無
-------	---

(b) 生理学的性質

硝酸塩の還元	—
--------	---

VPテスト	—
-------	---

クエン酸の利用	+
---------	---

ウレアーゼ	—
-------	---

オキシダーゼ	+
--------	---

カタラーゼ	+
-------	---

(c) 他の性質

温度抵抗性 60°Cで死滅する。

(3) 胞子形成関連遺伝子 *h o s* が不活性化されたこと、を特徴とする胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

(4) 胞子形成関連遺伝子 *h o s* の塩基配列が配列番号 1 に示す配列であること、を特徴とする請求項 3 に記載のブレビバチルス・チョウシネンシス。

(5) 胞子を形成せず、且つ、細胞外及び／又は細胞内のタンパク質分解酵素活性が低減ないし消失したブレビバチルス・チョウシネンシス。

(6) 下記の菌学的性質を有し、胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

(a) 形態

細胞の大きさ

液体培地: 0.4 ~ 0.6 × 1.5 ~ 4 μm

細胞の形 桧菌

胞子の有無 無

(b) 生理学的性質

硝酸塩の還元 一

VP テスト 一

クエン酸の利用 +

ウレアーゼ 一

オキシダーゼ +

カタラーゼ +

(c) 他の性質

温度抵抗性 60°Cで死滅する。

細胞外のタンパク質分解酵素活性 低いないしなし

細胞内のタンパク質分解酵素活性 低いないしなし

(7) 細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 *e m p* が不活性化されたこと、を特徴とするブレビバチルス・チョウシネンシス。

(8) 細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 *e m p* の塩基配列が配列番号 3 に示す配列であること、を特徴とする請求項 7 に記載のブレビバチルス・チョウシ

ネンシス。

(9) 細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* が不活性化されたこと、を特徴とするプレビバチルス・チョウシネンシス。

(10) 細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* の塩基配列が配列番号 5 に示す配列であること、を特徴とする上記 (9) に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス。

(11) 細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 *e m p* 及び細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* が不活性化されたこと、を特徴とするプレビバチルス・チョウシネンシス。

(12) 孢子を形成しないこと、を特徴とする上記 (11) に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス。

(13) プレビバチルス・チョウシネンシスHPD 31-SP3 (FERM B P-08479)。

(14) 上記 (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載のプレビバチルス・チョウシネンシスを、タンパク質をコードする遺伝子を組込んだ発現ベクターにより形質転換してなるプレビバチルス・チョウシネンシス。

(15) 上記 (14) に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス形質転換体を培養する工程を含むこと、を特徴とするタンパク質の製造方法。

(16) 上記 (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載のプレビバチルス・チョウシネンシスを組換えタンパク質生産の宿主として使用すること、を特徴とする組換えタンパク質を製造する方法。

本発明の孢子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシスは、親株であるプレビバチルス・チョウシネンシスに対して変異剤による薬剤処理を行い、薬剤処理の結果、得られた変異株の中から孢子形成能を有しない菌株を選択することにより取得した。実施例では、変異剤にニトロソグアニジンを使用したが、変異剤として亜硝酸、メタンスルホン酸エチルなども利用可能である。或いは、紫外線、 γ 線なども利用することができる。また、本発明の孢子形成能を有しない変異株を取得するための親株は、プレビバチルス・チョウシネンシスに属する

菌株であれば特に限定されないが、遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主として実績のあるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087)、または、その変異株のブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5 (FERM BP-6623) が特に好ましい。なお、得られた変異株の胞子形成能の有無は、耐熱性試験、或いは、D値の測定などにより行うことが可能である。また、D値 (D-value) は生細胞 (非胞子細胞) 及び胞子体を含むすべての菌数を1/10に減少させる各温度域での時間を意味し、菌体の死滅率の指標として用いられている。

また、本発明が提供する胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシス菌株に対してゲノム・ライブラリーを用いた解析を行い、胞子形成に関連していると推定される遺伝子が不活性化されている事を確認した。この不活性化された遺伝子をhosと命名した。胞子形成関連遺伝子hosのDNA配列の例としてブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のhosのDNA塩基配列を配列表の配列番号1 (図7、図8の上段) に示し、そのDNA塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号2 (図7、図8の下段) に示した。

また、本発明の細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が、格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシスは、ブレビバチルス・チョウシネンシスゲノム上の細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活性化を行うことにより得ることができる。本発明のタンパク質分解活性が格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシスを得るために、不活性化の対象とするブレビバチルス・チョウシネンシスのゲノム上のタンパク質分解酵素遺伝子は特に限定されないが、特に好ましいものとして細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子imp及び細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子empをあげることができる。

細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子empのDNA配列の例として、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のemp遺伝子のDNA塩基配列の配列番号3 (図9～11の上段) に示し、そのDNA配列に対応するブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の細胞外主要タンパク質分解酵素EMPのアミノ酸配列を配列番号4 (図9～11の下段) に示す。

また、細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子impのDNA配列の例として、

プレビバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 の i m p 遺伝子のDNA塩基配列を配列番号5（図12～13の上段）に示し、そのDNA配列に対応するプレビバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 の細胞内主要タンパク質分解酵素 I M P のアミノ酸配列を配列番号6（図12～13の下段）に示す。EMP及びIMPは、いずれも、公知のタンパク質とアミノ酸配列に40%以上の相同性がない新規なタンパク質である。

また、配列番号4に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素EMPに包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」とは、アミノ酸残基の種類やタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置によっても異なるが、前記配列番号4のアミノ酸配列全体に対し、60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を意味する。

更に、配列番号6に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素IMPに包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」とは、アミノ酸残基の種類やタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置によっても異なるが、前記配列番号6のアミノ酸配列全体に対し、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を意味する。

また、配列番号4に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であっても、そのコードしているタンパク質がタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素遺伝子 e m p （配列番号3）に包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」の意味は、上記したEMPについての場合と同様である。

また更に、配列番号6に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であっても、そのコードしているタンパク質がタンパク質分解活性を有する限り、

全てタンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* (配列番号 5.) に包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」の意味は、上記した *IMP*についての場合と同様である。*e m p* 遺伝子及び *i m p* 遺伝子も、従来単離されたこともなければ、DNA配列の決定もされておらず、従来未知の新規遺伝子である。

このブレビバチルス・チョウシネンシスのゲノム上の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* 及び細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 *e m p* のクローニングは、Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) 等に記載の当業者に公知の標準的な遺伝子組換え技術を適宜、選択し、組み合わせて用いることにより行うことができる。たとえば、ブレビバチルス・チョウシネンシスのゲノムDNAライブラリーを作製し、このゲノムDNAライブラリーに対して、不活性対象となる遺伝子をコードするDNA配列の一部を有するDNA断片をプローブに用いたハイブリダイゼーション法により、もしくは、このDNA断片をプライマーとして用いるPCR法により行うことができる。

また、ブレビバチルス・チョウシネンシスのゲノム上の *i m p* 遺伝子または *e m p* 遺伝子の不活性化は、公知の相同組換えに準じた方法により行うことができる。例えば、*i m p* 遺伝子の不活性化は、以下に示す手順により行うことができる。

まず、*i m p* 遺伝子を含むDNA断片をブレビバチルス・チョウシネンシスで複製不可能なベクター、例えば大腸菌で複製可能なベクターにクローニングし、*i m p* 遺伝子内部の一部領域をFRT配列 (Gene, 212, 77-86 (1998)) を両側に持つ薬剤耐性遺伝子 (例えばネオマイシン耐性遺伝子) からなるDNA断片に置きかえ *i m p* 遺伝子を分断する。その結果、その一部がネオマイシン耐性遺伝子に置きかわったことにより不活性化された *i m p* 遺伝子を含むベクターを得る。更に、このベクターに上記の不活性化された *i m p* 遺伝子がゲノムDNAに組み込まれたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株を選択するための第二の薬剤耐性遺伝子 (例えばエリスロマイシン耐性遺伝子) を挿入することにより、*i m p* 遺伝子不活性化用ベクターを構築する。

次いで、この *imp* 遺伝子不活性化用ベクターをプレビバチルス・チョウシネンシスに導入し、ネオマイシン耐性を示す菌株を選抜する。この *imp* 遺伝子不活性化用ベクターの導入により、一部のプレビバチルス・チョウシネンシス菌体において、ゲノム上の *imp* 遺伝子と、*imp* 遺伝子不活性化用ベクター上の不活性化された *imp* 遺伝子との間で相同組換え反応が誘発される。その結果、ネオマイシン耐性を示す菌株には、ネオマイシン耐性遺伝子-FRTカセットの上流側の *imp* 部のみで相同組換え反応が起こっている株、下流側の *imp* 部のみで相同組換え反応が起こっている株、上流側及び下流側の2箇所の *imp* 部で相同組換え反応が起こっている株（ダブルクロスオーバー株）が含まれることになる。

目的とするゲノム上の *imp* 遺伝子が不活性化された菌株はダブルクロスオーバー株であり、また、ダブルクロスオーバー株はエリスロマイシンに対して感受性を示す。そのため、これらのネオマイシン耐性を示す菌株を、更に、エリスロマイシンを含むTM寒天培地で培養し、エリスロマイシンに対する感受性を示す菌株を選抜する。以上により、ゲノム上の *imp* 遺伝子が不活性化されたプレビバチルス・チョウシネンシス菌株を得ることができる。

上記で得たプレビバチルス・チョウシネンシス菌株の *imp* 遺伝子の不活性化の確認は、PCRとゲノミックサザン解析などにより行うことができる。

更に、上記で得た *imp* 遺伝子不活性化株のゲノム上からネオマイシン耐性遺伝子の削除を行う。上記の *imp* 遺伝子不活性化株に導入されたネオマイシン耐性遺伝子は、その上流域と下流域にFRT配列を有しているため、FRT配列を特異的に認識するF1pリコンビナーゼを用いたFRT配列間の組換え反応により上記で得た *imp* 遺伝子不活性化株からネオマイシン耐性遺伝子を削除することが可能である。

具体的には、まず、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、プレビバチルス・チョウシネンシス菌体から容易に脱落するプラスミドベクターを調製する。更に、このプラスミドベクターに酵母由来のF1pリコンビナーゼ遺伝子（Nature, 286, 860-864 (1980)）とプレオマイシン耐性遺伝子を組み込んだネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターを作製する。

次いで、上記で得た *i m p* 遺伝子不活化株に、このネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターを導入し、更に、ブレオマイシンを含む TM 寒天培地上で培養することにより、このベクターにより形質転換された菌株を選別する。次いで、この形質転換された菌株を、ブレオマイシンを含まない TM 液体培地で振とう培養後、更に、TM 寒天培地で培養する。

目的とするネオマイシン耐性遺伝子が削除された *i m p* 遺伝子不活化株は、ネオマイシン耐性遺伝子の両側の F R T 配列間の組換え反応によりゲノム上のネオマイシン耐性遺伝子が削除され、なおかつ、ネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターが脱落している菌株である。この菌株は、ネオマイシンとブレオマイシンに對して感受性を示す。そこで、TM 寒天培地上にコロニーが得られた菌株からネオマイシンとブレオマイシンに對して感受性を示す菌株を選抜することにより、目的とするネオマイシン耐性遺伝子が削除された *i m p* 遺伝子不活化株を得た。

以上により、目的とするブレビバチルス・チョウシネンシスの *i m p* 遺伝子不活化株を得ることができる。以上の手順の概略を図 1 に示した。

また更に、タンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* 及び *e m p* の双方とも不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株は、上記により構築した *i m p* 遺伝子不活化株を親株に用いて、更に、そのゲノム上の *e m p* 遺伝子を不活化することにより得ることができる。*e m p* 遺伝子の不活化は、*i m p* 遺伝子の不活化と同様の手順を繰り返すことにより可能である。

なお、上記の方法においてマーカー遺伝子として用いられるネオマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子は例示であって、上記の方法に用いられるマーカー遺伝子の種類は特に限定されない。任意の複数のマーカー遺伝子を用い、上記の手順に従うことにより相同組換えによる遺伝子の不活化を行うことができる。

以上に記したブレビバチルス・チョウシネンシスゲノム上の細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活化により、本発明の細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が、公知の菌株より格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシス菌株を得ることができる。

ブレビバチルス・チョウシネンシス菌株のタンパク質分解活性は、ゼラチニー

PAGE (ザイモグラム) 法またはアゾカゼインやアゾコール等のタンパク質をアゾ化した基質を用いた方法などにより測定することができる。

以上に記載の方法により得られた、本発明の胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスの例としては、実施例に示すブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP1) を挙げることができる。また、公知の菌株より格段に細胞内のタンパク質分解活性が低減し、なおかつ、胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスの例としては、実施例に示すブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP2) を挙げることができる。また更に、公知の菌株より格段に細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が低減し、なおかつ、胞子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスの例としては、実施例に示すブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3) を挙げることができる。

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3) は、平成15年9月11日付で特許生物寄託センター（茨城県つくば市東一丁目1の1）にブダペスト条約下に国際寄託され、受託番号FERM BP-08479が与えられた。

本発明に係るブレビバチルス・チョウシネンシスは、(イ) 胞子を形成しない、(ロ) 細胞外主要タンパク質分解酵素活性が低いないしはない、(ハ) 細胞内主要タンパク質分解酵素活性が低いないしはない、の3要件の内の少なくともひとつを有する点で特徴的であり、他の性質は、通常のブレビバチルス・チョウシネンシスと格段に相違するものではない。その菌学的性質は次のとおりである。

(a) 形態

細胞の大きさ

液体培地： 0.4～0.6×1.5～4 μm

胞子の形 桿菌

胞子の有無 無

細胞の多形性の有無 無

運動性の有無 有 (周毛)

(b) 生理学的性質

硝酸塩の還元	—
V P テスト (アセトインの生成)	—
インドールの生成	—
硫化水素の生成 (T S I 寒天培地)	+
クエン酸の利用	+
無機窒素源の利用	
硝酸塩	—
アンモニウム塩	+
色素の生成 (キング培地)	—
ウレアーゼ	—
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
O-F テスト	分解せず
ゼラチンの分解	—
グルコースから酸の生成	—
キシロースから酸の生成	—
ラクトースから酸の生成	—
マルトースから酸の生成	—
生育できる pH	6 ~ 8.5

(c) 他の性質

温度抵抗性	60°Cで死滅する
細胞外のタンパク質分解酵素活性	低いないしなし (注1)
細胞内のタンパク質分解酵素活性	低いないしなし (注2)

(注1)

以下のいずれの方法においても培養上清中にタンパク質分解活性が検出されない。

(1) ゼラチニ PAGE によるゼラチンの分解活性測定法。

(2) 培養上清とアゾカゼインを反応させ、反応液の吸光度変化を計測するアゾ

カゼインの分解活性測定法。

(3) 培養上清とアゾコールを反応させ、反応液の吸光度変化を計測するアゾコールの分解活性測定法。

(注2)

ゼラチーン-PAGEによるゼラチーン分解活性の測定によっても、細胞内画分にゼラチーン分解活性が検出されない。

なお本発明において、「細胞外のタンパク質分解酵素活性が公知菌より格段に低減された」とは、アゾカゼイン法又はアゾコール法にて測定した場合の培養上清中の該酵素活性が、プレビバチルス・チョウシネンシス公知菌株の該酵素活性の1/10以下、好ましくは1/30以下、更に好ましくは1/100以下にまで低下することをいい、後記する実施例では、1/120以下、1/330以下のデータも示されている。

同じく「細胞内のタンパク質分解酵素活性が公知菌株より格段に低減された」とは、アゾカゼイン法により測定した場合の細胞内画分中の該酵素活性が、プレビバチルス・チョウシネンシス公知菌株の該酵素活性の1/2以下、好ましくは1/5以下、更に好ましくは1/8～1/10以下をいう。

これらの低減値は、アゾカゼイン法やアゾコール法で測定した場合のものであるので、他の方法で測定した場合には、これらの低減値に基づいてそれぞれの低減値を規定すればよいことはいうまでもない。

更に、本発明は、上記のプレビバチルス・チョウシネンシスを宿主菌として用いる遺伝子組換えによるタンパク質生産方法を提供する。

本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスを宿主菌として用いたタンパク質生産に用いられる発現ベクターは、プレビバチルス・チョウシネンシス中で複製可能であるものならば特に限定されないが、好ましいものとしてバチルス・プレビス47の主要菌体外タンパク質遺伝子(MWP遺伝子)のプロモーター領域、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の主要菌体外タンパク質遺伝子(HWP遺伝子)のプロモーター領域を有する発現ベクターを挙げることができる。また、通常、プレビバチルス・チョウシネンシスを宿主とする組換えタンパク質生産系において生産されたタンパク質は、宿主細胞内に蓄積せずに、細胞外への

分泌を行うため、プロモーター領域をコードするDNA配列の3'末端側に分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列を含むものが望ましい。分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列として好ましいものとして、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の主要菌体外タンパク質の分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列などを挙げることができる。

具体的には、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いた組換えタンパク質生産に用いられる発現ベクターとして好ましいものとして、pHT110(特開平6-133782)、pNY301(特開平10-295378)等を挙げることができる。

本発明において発現ベクターに組み込まれるタンパク質をコードするDNAは、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いた組換えタンパク質生産において、その発現が可能であるものであれば特に限定されない。例えば、サイトカイン、ケモカイン、酵素、ホルモンなどの遺伝子、もしくは、その他の任意のペプチドをコードするDNA断片などのいずれであってもよい。また、遺伝子組換えにより生産されるタンパク質の用途も特に限定されない。その用途は医薬品、生化学試薬、産業用酵素などのいずれであってもよい。

発現ベクターへのタンパク質をコードするDNAの挿入は、精製された当該タンパク質をコードするDNAを適当な制限酵素で処理することにより得たDNA断片を発現用ベクターの適当な制限酵素切断部位またはマルチクローニングサイトに挿入し、連結するなどの当業者に公知の一般的な方法により行うことができる。

更に上記のタンパク質をコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスに導入することによりプレビバチルス・チョウシネンシスの形質転換を行うことができる。本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスへの発現ベクターの導入の方法も特に限定されず、当業者に公知の方法を適宜選択して行えばよいが、特に好ましい方法として、プレビバチルス・チョウシネンシスへの発現ベクターの導入に通常用いられるエレクトロポレーション法を例示することができる。

更に、この形質転換体を用いたタンパク質の生産は、この形質転換体を適切な

培地に接種、培養し、培養終了後、タンパク質を回収・精製することにより行う。

本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスの形質転換体の培養条件も、形質転換体の培養及び組換えタンパク質遺伝子の発現が可能なものであるならば、特に限定されないが、特に好ましい条件として、本明細書の実施例で用いたTM培地（ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.2%、グルコース 1%、pH 7.0）または2SL培地（ペプトン 4%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2%、pH 7.2）で30°C、2~4日間の培養条件を例示することができる。

また、必要に応じて、硫酸鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛などの無機塩類を適宜加えてよい。

更に、組換えタンパク質が分泌生産される場合には、培養終了後、遠心分離、ろ過などの一般的な方法でプレビバチルス・チョウシネンシスの培養細胞と分泌生産されたタンパク質を含む上清を分離することにより生産された組換えタンパク質を回収することができる。

また、生産されたタンパク質が分泌生産されず、プレビバチルス・チョウシネンシスの細胞内に蓄積される場合にも、当業者に公知の方法を適宜用いることにより、細胞内に蓄積生産されたタンパク質を回収することができる。例えば、培養液から遠心分離、ろ過などの方法により菌体を採取し、次いで、この菌体を超音波破碎法、フレンチプレス法などにより破碎し、また必要に応じて界面活性剤等を添加して可溶化することにより、細胞内に蓄積生産されたタンパク質を回収することができる。

更に、生産されたタンパク質の精製を行う場合には、当業者に公知の方法、たとえば溶媒抽出、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、電気泳動、等電点沈殿などの方法を適宜、単独または組み合わせて用いることにより行うことができる。

発明の効果

本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスは、遺伝子組換えによるタンパク

質生産における宿主として利用することができる。

本発明は、細胞外のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。該プレビバチルス・チョウシネンシスは、分泌生産される組換えタンパク質生産の宿主に用いられた場合、細胞外のタンパク質分解活性による組換えタンパク質の分解を顕著に抑制する。そして、このことにより、該プレビバチルス・チョウシネンシスは公知のプレビバチルス・チョウシネンシスより効率的な組換えタンパク質の分泌生産を可能にする。

また、本発明は、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。該プレビバチルス・チョウシネンシスは、細胞内に蓄積生産される組換えタンパク質生産の宿主に用いられた場合、細胞内のタンパク質分解活性による組換えタンパク質の分解を顕著に抑制する。そして、このことにより、該プレビバチルス・チョウシネンシスは公知のプレビバチルス・チョウシネンシスより効率的な組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産を可能にする。

また更に、本発明は、胞子体を形成しないプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。該プレビバチルス・チョウシネンシスは、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するため、組換えタンパク質医薬品の製造を初めとする産業上の広範な用途において組換えタンパク質生産の宿主として利用することが可能である。

したがって、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスは遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主として極めて有用である。本菌のひとつHPD 31-S P 3株を国際寄託したが (FERM BP-08479)、この菌株は上記3条件をいずれも満足する新規3重欠損株である。

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明をこれらの実施例のいずれかに限定することを意図するものでない。

実施例

実施例1

(胞子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシス変異株の取得)

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD 3 1 (FERM BP-1087) (FERM BP-6863) に対してニトロソグアニジンによる変異剤処理を行い、胞子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシス変異株の取得を試みた。

まず、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD 3 1をTM液体培地 (ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.2%、グルコース 1%、pH 7.0) で一晩、30°Cで培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を回収し、更に、回収した菌体を滅菌水でODが0.1になるように洗浄希釈した。次いで、この菌体に100mg/LとなるようにNメチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを添加し、生存率が1~10%となるように振とうすることで、変異剤処理を行った。

次いで、変異剤処理を行った菌体を滅菌水で適宜希釈した後、TM平板培地に塗抹し、3日間30°Cで培養を行い、TM平板培地上に菌株のコロニーを形成させた。通常のプレビバチルス・チョウシネンシスのコロニーと異なり、表面にシワがない平滑なコロニーを形成した菌株を選択し、更に、これらの選択した菌株の内から顕微鏡観察により胞子が確認できないものを胞子形成能を有しない可能性がある菌株として選択した。以上の変異処理及びコロニー形成を繰り返すことにより胞子形成能を有しない可能性がある変異株を5株得た。

実施例 2

(変異株の耐熱性試験による胞子形成能の評価)

実施例1で得た5株の変異株について耐熱性試験による胞子形成能の評価を行った。試験の対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD 3 1を用いた。

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD 3 1及び変異株5株 (No. 1~No. 5) をそれぞれTM寒天培地に塗布し、30°Cで7日間静置培養した。なお、胞子体を形成させるために通常の培養期間より長い7日間の培養を行った。培養終了後、660nmにおける吸光度が1.0になるように菌体を0.8%NaClを含む滅菌蒸留水に懸濁し、菌体懸濁液100μlを80°Cで10分間保温した後、TM寒天培地に塗布した。更に30°Cの恒温で24時間培養し、生育した

コロニー数から生菌数を計測した。

また、80°C加熱処理前の菌体懸濁液を段階的に滅菌蒸留水にて希釈後、T M寒天培地に塗布し、30°Cの恒温で24時間培養した。培養終了後、生育したコロニー数から生菌数を計測した。以上の結果を表1に示す。

(表1)

菌 株	80°C加温前	80°C加温後
プレビバチルス・		
チョウシネンシスHPD31	3.3×10^7	1.9×10^7
プレビバチルス・		
チョウシネンシス変異株No. 1	4.3×10^6	0
プレビバチルス・		
チョウシネンシス変異株No. 2	1.7×10^7	0
プレビバチルス・		
チョウシネンシス変異株No. 3	2.6×10^6	0
プレビバチルス・		
チョウシネンシス変異株No. 4	6.5×10^6	0
プレビバチルス・		
チョウシネンシス変異株No. 5	8.1×10^6	0

上記の表1が示すように、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31は、80°C、10分間の加温によって全菌数の約1/2程度しか死滅しないのに対し、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5は同条件によって完全に死滅する。つまり耐熱性胞子を形成しないことが強く示唆された。

実施例 3

(変異株のD値の測定)

次いで、ブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5について菌体のD値の測定試験を行った。試験の対照にはブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5のそれぞれをTM寒天培地に塗布し、30℃で7日間静置培養した。培養終了後、660 nmにおける吸光度が1.0になるように菌体を0.8%滅菌食塩水に懸濁後、60℃、70℃及び80℃の各温度で保温し、保温開始から1分後、2分後、3分後、5分後、10分後、20分後、30分後、60分後の各々の時点で懸濁液を分取した。次いで分取した各々の懸濁液を冷却した後、TM寒天培地に塗布し30℃で24時間培養した。培養終了後、生育したコロニー数から菌数を計測した。更に、計測した菌数から胞子体の数を1/10に減少させる時間として菌体のD値を求めた。

なお、通常、ブレビバチルス・チョウシネンシスの生細胞（非胞子菌体）は、60℃以上の温度域において直ちに死滅するため、試験開始後1分において残存している菌体は、すべて胞子体であると仮定して計算を行った。以上の結果を表2に示す。

(表2)

菌 株	D値 (分間)		
	60°C	70°C	80°C
プレビバチルス・			
チョウシネンシスHPD31	330	94	67
プレビバチルス・			
チョウシネンシス変異株No. 1	ND	ND	ND
プレビバチルス・			
チョウシネンシス変異株No. 2	ND	ND	ND
プレビバチルス・			
チョウシネンシス変異株No. 3	ND	ND	ND
プレビバチルス・			
チョウシネンシス変異株No. 4	ND	ND	ND
プレビバチルス・			
チョウシネンシス変異株No. 5	ND	ND	ND

ND：測定不能（1分未満）

表2に示すとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31については、各温度域での菌体のD値を求めることができた。しかしながら、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5については、各温度域での試験開始後、1分間以内に全ての菌株が死滅したため、いずれの温度域でも菌体のD値を求めることができなかった。この結果は、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5は、いずれも、胞子体を形成しなかったためであると考えられる。

以上に示した80°C、10分間の恒温試験及びD値の測定試験の結果により、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5は、胞子形成能を

有さず、また、60°Cに1分間置くことで完全に死滅することが確認された。

実施例4

(変異株No. 1～No. 5を宿主に用いた組換えタンパク質(hEGF)の生産)

更に、ブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5について組換えhEGFの生産を行うことにより組換えタンパク質の生産性の評価を行った。その手順と結果を以下に示す。対照にはブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及び変異株No. 1～No. 5のそれぞれを、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)を発現するプラスミドベクター-pHT110・EGF(特開平6-133782)をエレクトロポレーション法により導入することで形質転換した。次いで、それぞれの菌株の形質転換体を2SL液体培地(ペプトン4%、酵母エキス0.5%、グルコース2%、pH7.2)3mlを用いて30°Cで60時間振とう培養した。変異株No. 4とNo. 5については形質転換体を得ることができなかった。

培養終了後、培養液を遠心分離し、上清画分を蒸留水によって10倍に希釈した後、HPLC分析に供した。得られたピーク面積から培養液中に分泌生産された組換えhEGFの量を算出した。その結果を表3に示す。なお、表3では、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31でのhEGFの生産量を100%として換算した値を示した。

(表3)

宿主菌株	h EGF相対生産量 (%)
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	100
ブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1	119
ブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 2	40
ブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 3	20

上記の表3が示すように、ブレビバチルス・チョウシネンシス変異株No.1を宿主に用いた場合のh EGFの生産量は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を多少上回っていた。また、その生育や形質転換効率もHPD31と同等であった。

上記変異株No. 1をブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1 (Brevibacillus choshinensis HPD31-SP1) と命名した。

実施例5

(ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1の変異遺伝子の同定)

また、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1のゲノム上で変異を受けた遺伝子の同定を行った。変異を受けた遺伝子の同定は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムライプラリーを作製し、このライプラリーの各々をSP1に導入し胞子形成能が復活した菌株を選抜することにより行った。

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムライプラリーは以下の手順により作製した。まず、TM培地で15時間培養したブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31からゲノムDNAを調製し、次いで、制限酵素Sau3AIによってゲノムDNAを部分的に処理し、ゲノムDNAの断片を得た。得られたゲノムDNAの断片と制限酵素BamHIで処理したプラスミドベクターpNY301とでライゲーション反応を行い、ゲノムライプラリープラスミドDN

- Aを作製した。更に、これらのゲノムライブラリープラスミドDNAをエレクトロポレーション法によりプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1に導入した。

次いで、このゲノムライブラリープラスミドDNAを導入したプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1の形質転換体を（抗生物質を含まない）TM液体培地で30°Cで1時間培養し、更に、ネオマイシンを含むTM液体培地で30°Cで3日間培養した。培養終了後、80°Cで10分間加熱処理を行い、更に、TM寒天培地に塗抹し30°Cで3日間培養した。この培養によりコロニーを形成した菌株を胞子形成能が復活した菌株として選択した。

その結果、胞子形成能が復活した菌株が8株得られた。次いで、これらの8株から先に導入したプラスミドDNAを抽出し、そのDNA配列を決定した。その結果、8株の内、3株において新規な遺伝子がコードされた共通の翻訳枠が存在することが明らかになった。この結果から、変異株プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1は、変異剤処理によってこの遺伝子が不活性化されて胞子形成能が失われたと推定した。この共通の翻訳枠にコードされた新規な遺伝子をhosと命名した。また、そのDNA配列を配列番号1（図7、図8の上段）に示した。

更に、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を親株にhos遺伝子の不活性化株を作製し、hos遺伝子の不活性化によりプレビバチルス・チョウシネンシスの胞子形成能が失われることを確認した。

hos遺伝子不活性化株の作製は、公知の相同組換えに準じた方法により行った。以下に、その具体的手順を示す。

まずhos遺伝子不活性化用ベクターの構築を行った。プライマーHoSP1及びHoSP2を用いたPCRによりhos遺伝子の上流部分のDNA断片（1.5kbp：上流側にKpnI、下流側にBamHI認識配列を導入）を増幅し、更に、このPCRで増幅した1.5kbpのDNA断片を制限酵素KpnI及びBamHIで処理しDNA断片を回収した。また、プライマーHoSP3及びHoSP4を用いたPCRによりhos遺伝子の下流部分の約1.5kbpのDNA断片（上流側にPstI、下流側にXbaI認識配列を導入）を増幅した

後、この約1. 5 k b p のDNA断片を制限酵素Pst I 及びXba I で処理しDNA断片を回収した。また更に、ネオマイシン耐性遺伝子を含みFRT配列(Gene, 212, 77-86 (1998)) を両側に持つDNA断片(1. 4 k b p) を制限酵素BamHI 及びPst I で処理しDNA断片を回収した。

また、プレビバチルス・チョウシネンシスで複製不可能なベクターであるpBlue script[®] II SK+ (東洋紡績株式会社) のSac I 認識配列に同制限酵素により切り出されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を挿入した。次いで、このプラスミドDNAのKpn I / Xba I 制限酵素切断部位に、上述の3つのDNA断片を同時に導入することにより、hos 遺伝子不活性用ベクターを構築した。以上により構築したhos 遺伝子不活性用ベクターをpBlue-hos :: Nm^rとした。また、上記で使用したプライマーHos P1, Hos P2, Hos P3 及びHos P4 の塩基配列を、それぞれ、配列番号7、8、9、10に示し、これらをまとめて図14に示した。

次いで、このhos 遺伝子不活性用ベクターpBlue-hos :: Nm^rをエレクトロポレーション法によりプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 に導入し、ネオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。更に、得られたネオマイシン耐性を示す株を、エリスロマイシンを含むTM寒天培地に塗抹し、30°Cで2日間培養し、エリスロマイシンに対する感受性を指標に菌株を選抜した。選抜した菌株のhos 遺伝子不活性の確認は、PCRとゲノミックサザン解析により行った。更に、下記の実施例7に記載の手順に従ってhos 遺伝子不活性株からネオマイシン耐性遺伝子の削除を行い、プレビバチルス・チョウシネンシスのhos 遺伝子不活性株を得た。

次いで、このhos 遺伝子不活性株について実施例2、3の手順に従って胞子形成能の評価試験を行い、胞子形成能を有していないことを確認した。

また更に、このhos 遺伝子不活性株について実施例4の手順に従って組換えタンパク質の生産性評価試験を行い、hEGFの生産性がプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1と同等であることを確認した。

以上の試験結果により、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1は、変異剤処理によりhos 遺伝子に変異が生じたためhos 遺伝子が不活性

しており、その結果、胞子形成能が失われたと結論した。

細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子が不活性化されたブレビバチルス・チョウシネンシスの作製

実施例 6

(細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *i m p* のクローニング)

(6-1) *i m p* のクローニング

不活性化対象となるタンパク質分解酵素を特定するため、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087) の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子のクローニングを行った。

実施例5に記載の手順に従って構築したブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムライブラリープラスミドDNAによって、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を形質転換し、更に、これらの形質転換体を1%スキムミルクと終濃度50 μg/m1のネオマイシンを含むTM寒天培地に塗抹し、30°Cで4日間培養した。培養終了後、スキムミルクの分解を示すハローを形成した株を選抜した。

更に、上記で得た株からプラスミドDNAを抽出し、DNA配列分析を行った。その結果、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31ゲノム由来の3.6 kb pのDNA断片中に約1.4 kb pの翻訳枠 (ORF)、また、そのDNA断片の相補配列に約0.7 kb pのORFが存在していた。この約3.6 kb pのDNA断片が含まれるプラスミドをpNY-*i m p*と命名した。

上記の3.6 kb pのDNA断片中に含まれるふたつのORFの内、約1.4 kb pのORFのみを含むプラスミドと約0.7 kb pのORFのみを含むプラスミドを作製し、それぞれのプラスミドにより、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の形質転換を行った。

更に、それぞれの形質転換体を、1%スキムミルクを含むTM寒天培地で培養したところ、約1.4 kb pのORFのみを有するプラスミドを含む形質転換体のみがTM寒天培地上でハローを形成したため、この約1.4 kb pのORFにタンパク質分解酵素がコードされていることが明らかになった。この約1.4 kb

b p の O R F にコードされたタンパク質分解酵素を細胞内主要タンパク質分解酵素 (intracellular major protease) 、略して I M P と命名した。 I M P と他の公知のタンパク質との間でアミノ酸配列の相同性検索を行ったが、有意な相同性を有するタンパク質は発見されなかった。

このブレビバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 株由来の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 i m p の D N A 塩基配列を配列番号 5 (図 1 2 ~ 1 3 の上段) に示し、その D N A 配列に対応する細胞内主要タンパク質分解酵素 I M P のアミノ酸配列を配列番号 6 (図 1 2 ~ 1 3 の下段) に示す。

(6-2) i m p 遺伝子の発現及び I M P タンパク質の精製

次いで、 I M P の性質の詳細を明らかにするために i m p 遺伝子の発現及び I M P タンパク質の精製を行った。

まず、生産された I M P タンパク質の精製を容易にする目的で I M P の C 末端に 8 つのヒスチジンからなるペプチドタグ (ヒスチジンタグ) を付加したポリペプチドを発現するプラスミドベクター p N Y - i m p - H i s を構築した。プラスミドベクター p N Y - i m p - H i s の構築は以下の手順により行った。

まず、センスプライマー i m p P 1 とアンチセンスプライマー i m p P 2 を用いて p N Y - i m p プラスミド D N A を鑄型とする P C R を行った。なお、センスプライマー i m p P 1 は、 I M P の N 末端と推定されるアミノ酸配列をコードする D N A 配列と相同なプライマーである。また、アンチセンスプライマー i m p P 2 は、ヒスチジンタグをコードするため g t g を 8 回繰り返した D N A 配列を付加し、更に、ストップコドンと制限酵素 E c o R I 認識配列を導入したプライマーである。このセンスプライマー i m p P 1 の塩基配列を配列番号 1 1 に示し、アンチセンスプライマー i m p P 2 の塩基配列を配列番号 1 2 に示し、そして更に、これらをまとめて図 1 5 に示した。

この P C R により増幅されたヒスチジンタグをコードする配列と i m p 遺伝子を含む D N A 断片を精製後、制限酵素 X h o I と E c o R I で処理し約 5 0 0 b p の D N A 断片を得た。次いで、この D N A 断片をプラスミド p N Y - i m p の X h o I / E c o R I 制限酵素切断部位に挿入し、プラスミドベクター p N Y - i m p - H i s を得た。

次いで、上記で得たプラスミドベクターpNY-imp-Hisによりプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を形質転換し、得られた形質転換体を600mlのTM液体培地で30°C、48時間振とう培養した。培養終了後、6000×gの遠心分離によって菌体を回収し、30mlの洗浄緩衝液(20mMリン酸、pH7.4、2M KC1)に懸濁し、再度6000×gの遠心分離によって菌体を回収した。この洗浄操作を2回繰り返した後、0.2mg/mlのリゾチームと10単位のDNaseを含む30mMの溶菌緩衝液(20mMリン酸、pH7.4)に菌体を懸濁し、37°Cの恒温に20分間置いた。次いで、超音波処理によって菌体を破碎し、34000×gで30分間遠心し、上清を細胞内画分として回収した。細胞内画分30mlを0.22μmのフィルターによって濾過した後、終濃度0.5MのNaClと10mMイミダゾールを添加し、1mlのニッケルキレートカラム(アマシャムファルマシア社)に供した。10-500mMイミダゾールの直線濃度勾配によってニッケルキレートカラムに吸着したIMPタンパク質を溶出し分取した。QuantiCleave(登録商標) Protease Assay Kit(Pierce Biotechnology, Inc.)によって分画された溶出液のプロテアーゼ活性を測定しIMP活性画分を同定した。更に、活性画分5μlをSDS-PAGEに供しIMPタンパク質が電気泳動上で単一にまで精製されていることを確認した。

(6-3) IMPの性質

IMP 10μgを含むIMPの精製酵素標品をアクリルアミド10%濃度のSDS-PAGEによって分離した後、セミドライ式タンパク質転写装置によってタンパク質をPVDF膜に転写し、0.01%CBB(クマシープリリアントブルー)と40%メタノールからなる染色液でIMPのタンパク質バンドを検出した。次いで、CBBを含まない40%メタノール液でPVDF膜を脱色した後、膜を乾燥させた。次いで、膜からIMPのタンパク質バンドを切り出し、そのN末端アミノ酸配列分析を行い、そのN末端配列がMetAsnHisProAspであることを確認した。以上により、IMPは453アミノ酸残基からなる推定分子量49,811Daの細胞内タンパク質分解酵素であることが判明した。

次いで、QuantiCleave（登録商標）Protease Assay Kit（Pierce Biotechnology, Inc.）を用いて、精製IMPの酵素化学的性質を詳細に検討した。基質であるスクシニル化カゼイン 2mgを100mM ホウ酸緩衝液（pH 8.0）65μlに溶解した酵素反応溶液に、IMPを1.5μg含む精製酵素標品10μlを加え37℃の恒温に20分間置いた。次いで、発色液25μlを添加し、20分間、室温で放置した。発色後、450nmの吸光度を測定することにより、IMPのタンパク質分解活性を定量した。このタンパク質分解活性の定量において30℃、60分間の反応により450nmの吸光度を0.1上昇させる酵素量を1単位とし、反応に用いた酵素タンパク質量はBSAを標準としてBradford法により定量した。

以上の結果により、IMPの至適温度は30℃、至適pHは8.0、比活性は44.7 units/mg proteinであり、またIMPは1mM以上のEDTAにより活性が阻害されることが明らかになった。

実施例7

（細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスの作製）

次いで、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SPIを親株に *imp* 遺伝子が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスの作製を行った。 *imp* 遺伝子が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスの作製は相同組み換えによる遺伝子の不活化法に準じた方法を用いた。具体的には、以下の手順により行った。

まず、 *imp* 遺伝子不活化用ベクターの構築を行った。制限酵素EcoRVによって *imp* 遺伝子の内部領域である1kbのDNA断片を切り出し、プラスミドベクター pBlue script[®] II SK+（東洋紡績株式会社）のSmaI/EcoRV制限酵素切断部位に挿入した。次いで、制限酵素PstIで処理することによって *imp* 遺伝子内部の120bpの領域を除去し、ネオマイシン耐性遺伝子を含みFRT配列を両端に持つDNA断片をPstI制限酵素切断

部位に挿入することにより、i m p 遺伝子を分断した。更に、このプラスミドの B a m H I 制限酵素切断部位に同制限酵素によって切り出されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を挿入することにより、i m p 遺伝子不活性化用ベクターを構築した。以上により構築したi m p 遺伝子不活性化用ベクターをp B 1 u e - i m p : : N m^rとした。

次いで、このi m p 遺伝子不活性化用ベクターp B 1 u e - i m p : : N m^r 1 μ gをエレクトロポレーション法によりプレビバチルス・チョウシネンシスHP D 3 1 - S P 1に導入し、ネオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。得られたネオマイシン耐性を示す菌株を終濃度1 μ g / m lのエリスロマイシンを含むTM寒天培地（ペプトン 1%、肉エキス 0. 5%、酵母エキス 0. 2%、グルコース 1%、寒天 1. 5%、p H 7. 0）に塗抹し、30°C、2日間培養し、i m p 遺伝子の上流域と下流域の2箇所の遺伝子座で相同組み換え反応を起こした株（ダブルクロスオーバー株）をエリスロマイシンに対する感受性を指標に選抜した。更に、選抜した菌株に対してPCRとゲノミックサザン解析を行いi m p 遺伝子が不活性化されている事を確認した。

次いで、上記で構築したi m p 遺伝子不活性化株のゲノムからネオマイシン耐性遺伝子の削除を行った。i m p 遺伝子不活性化株からネオマイシン耐性遺伝子を削除するために、まず、酵母由来のF 1 p リコンビナーゼ遺伝子とプレオマイシン耐性遺伝子を有するネオマイシン耐性遺伝子削除用プラスミドベクターを以下の方法により構築した。

まず、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、プレビバチルス・チョウシネンシスの菌体から容易に脱落するプラスミドベクターを得るために、p N Y 3 0 1 プラスミドベクター（特開平10-295378）に対してヒドロキシルアミンによる薬剤処理を行い、その変異体を得ることにした。具体的には、以下のようにして行った。

p N Y 3 0 1 プラスミドベクターDNA 1. 5 μ gを、ヒドロキシルアミン350 m gとN a O H 9 0 m gを氷冷した滅菌蒸留水5 m lに溶解した溶液（1 0 0 μ l）に溶解し、70°Cの恒温に120分間おいた後、プラスミドDNAをエタノール沈澱により濃縮、乾燥させた。更に、このプラスミドDNAを滅菌蒸

留水に溶解し、100ng相当の該プラスミドDNAにより、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を形質転換し、ネオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。生育速度が遅くコロニーサイズが小さい形質転換体から得られたプラスミドDNAは、元のpNY301プラスミドベクターDNAに比べ1細胞あたりのコピー数が数十分の1に低下しており、かつ、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、菌体から容易に脱落した。

このプラスミドDNAを鋳型にEcoRIとPstI認識配列を付加したセンスプライマーf1p P1（配列番号13：図16）とBamHI認識配列を付加したアンチセンスプライマーf1p P2（配列番号14：図17）を用いてPCRを行い、rep遺伝子を含む約1.6kbpのDNA断片を増幅した。更に、約1.6kbpのDNA断片を制限酵素EcoRIとBamHIで処理した。

また、プレオマイシン耐性遺伝子を有するpNH300プラスミド（Yasuhiro, Shiga et al, Applied and Environmental Microbiology, 58, 525-531 (1992)）を鋳型にBglII認識配列を付加したセンスプライマーf1p P3（配列番号15、図18）とEcoRIとXbaI認識配列を付加したアンチセンスプライマー-f1p P4（配列番号16、図19）によってPCRを行いプレオマイシン耐性遺伝子とプラスミドoriを含む約1.1kbpのDNA断片を増幅した。更に、1.1kbpのDNA断片を制限酵素EcoRIとBglIIで処理し、上記で得た約1.6kbpと約1.1kbpの両DNA断片を結合させることにより新たなプラスミドを作製した。このプラスミドをpNY-Mut-B1eとした。

また、酵母由来の2- μ mプラスミドを鋳型に、NcoI認識配列を付加したセンスプライマーf1p P5（配列番号17：図20）とXhoI認識配列を付加したアンチセンスプライマーf1p P6（配列番号18：図21）を用いてPCRを行い、F1pリコンビナーゼ遺伝子を含む領域を増幅した。次いで、このPCRにより得たF1pリコンビナーゼ遺伝子を含むDNA断片をNcoIとXhoIで処理した後、pNY301ベクターのNcoI/XhoI制限酵素切断部位に挿入することによりF1pリコンビナーゼ遺伝子を含むベクターを得た。このベクターをpNY301-F1pとした。

次いで、このpNY301-F1pを鋳型にXbaI認識配列を付加したセンスプライマーf1p P7(配列番号19:図22)とPstI認識配列を付加したアンチセンスプライマーf1p P8(配列番号20:図23)を用いてPCRを行い、F1pリコンビナーゼ遺伝子及びpNY301由来のプロモーター領域を含む約1.6kbのDNA断片を増幅した。更に、この約1.6kbのDNA断片を制限酵素XbaIとPstIで処理した後、上記で得たpNY-Mut-B1eのXbaI/PstI制限酵素切断部位に挿入することによりネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターを構築した。このネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターをpNY-Mut-B1e-F1pとした。このpNY-Mut-B1e-F1pは、F1pリコンビナーゼ遺伝子を発現し、かつ、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、ブレビバチルス・チョウシネンシスの菌体から容易に脱落するプラスミドベクターである。

次いで、このネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターpNY-Mut-B1e-F1pをエレクトロポレーション法によりimp遺伝子不活化株に導入し、ブレオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。次いで、この形質転換体を、ブレオマイシンを含まないTM液体培地で振とう培養し、更に、TM寒天培地で培養した。TM寒天培地上にコロニーが得られた菌株からネオマイシンとブレオマイシンに対して感受性を示す菌株を選抜した。

以上により、ネオマイシン耐性遺伝子が削除され、かつ、ネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターpNY-Mut-B1e-F1pが脱落した、目的とするブレビバチルス・チョウシネンシスのimp遺伝子不活化株を得た。このゲノム上の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子impが不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスをブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2(Brevibacillus choshinensis HPD31-SP2)と命名した。

(細胞内と細胞外の主要タンパク質分解酵素遺伝子が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスの作製)

次いで、上記で得たimp遺伝子が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2に対して細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活化を行った。そのために、まず、細胞外主要タンパク質分解酵素の単離、及び、

同遺伝子のクローニングを行った。

実施例 8

(細胞外主要タンパク質分解酵素 (Extracellular Major Protease, EMPと略記) 遺伝子のクローニング)

(8-1) 細胞外主要タンパク質分解酵素 (EMP) の精製

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087) を5 LのTM液体培地で24時間培養し、培養終了後、培養上清液を遠心分離により分画し、終濃度50 mMのトリス塩酸 (pH 7.5) を添加した後、DEAE陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、0-0.6 M NaClの直線濃度勾配によりEMPを溶出した。

EMP含有画分を50 mMトリス塩酸 (pH 7.5) の緩衝液に対して透析した後、ヘパリンカラムに供し、0-0.5 MのNaClの直線濃度勾配により溶出し、EMP精製酵素標品とした。また、各溶出画分の酵素活性測定は、Analytical Biochemistry, 102, 196-202 (1980) の方法に準じたゼラチン-PAGEにより行った。

(8-2) EMPのアミノ酸配列分析

8-2-1 N末端アミノ酸配列分析

EMP精製酵素標品10 µgをアクリルアミド10%濃度のSDS-PAGEによって分離した後、セミドライ式タンパク質転写装置によってタンパク質をPVDF膜に転写し、0.01% CBBと40%メタノールからなる染色液でEMPのタンパク質バンドを検出した。CBBを含まない40%メタノール液で脱色した後、膜を乾燥させ、タンパク質バンドを含む膜を切り出し、ABIプロテインシーケンサー model 492によりN末端アミノ酸配列分析を行った。このアミノ酸配列分析により、AlaSerLysArgValHisThrAspAsnLeuValIleAlaLeuValGluPheAsnAspLeuGluGlyAsnGlnの24アミノ酸残基からなるN末端のアミノ酸配列を決定した。

8-2-2 内部部分アミノ酸配列分析

EMP精製酵素標品 50 μg をアクリルアミド 10% 濃度の SDS-PAGE によって分離した後、EMPのタンパク質バンドを含むゲル片を切り出し、更に、current protocols in protein science, 11.3 digestion of proteins in gel for sequence analysis, John Wiley & Sons, 1995 の方法に従い、EMPをトリプシン 1 μg によりゲル内酵素処理を行いゲル内で限定分解した。次いで、トリプシン処理をしたEMPのペプチド断片をアセトニトリル溶液で回収した後、マイティシルアクア PR 18 逆相カラムクロマトグラフィー(関東化学株式会社)に供し、0.05%TFAを含むアセトニトリル 0-60% の直線濃度勾配によってEMPのペプチド断片を溶出分離した。更に溶出分離したEMPのペプチド断片を乾固した後、ABI プロテインシーケンサー model 492 によりペプチド断片のひとつについてアミノ酸配列分析を行った。このアミノ酸配列分析により、IlePhenThrGlnProThrGlyPheAspの10アミノ酸残基からなる内部部分アミノ酸配列を決定した。

(8-3) emp 遺伝子のクローニング及び同定

次いで、上記で得たEMPの内部部分アミノ酸配列データを基に、2種のオリゴヌクレオチドプライマー emp P1 及び emp P2 を設計、合成した。emp P1 の塩基配列を配列番号 21 に、emp P2 の塩基配列を配列番号 22 にそれぞれ示す。また、emp P1 及び emp P2 の塩基配列、並びに、emp P1 及び emp P2 の塩基配列に対応するアミノ酸配列を図 24 にまとめて示す。なお、配列番号 21 の配列における左から 6 番目の n 及び配列番号 22 の配列における左から 6 番目の n は、イノシンである。

これらのプライマー emp P1 及び emp P2 を用いて、プレビバチルス・チョウシネンシス H PD31 のゲノムDNAを鑄型とするPCRを行い、約 700 bp のDNA断片を増幅した。更に、この約 700 bp のDNA断片を pUC 118ベクター(東洋紡績株式会社)の Hind II 認識配列にサブクローニングしDNA配列分析を行い、この約 700 bp のDNA断片が emp 遺伝子の一部を含んでいることを確認した。

更に、この約 700 bp のDNA断片の上流域及び下流域のDNA断片をクローニングするために、上記で得た約 700 bp のDNA断片のDNA配列データ

を基に下に示す2種類の特異的プライマー、上流域の増幅用にアンチセンスプライマーemp P3、下流域の増幅用にセンスプライマーemp P4を設計、合成した。

また、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムDNAをEco RV等の制限酵素によって断片化し、更に、これらのDNA断片の末端にアダプターDNAを付加することによりプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のアダプターゲノムDNAライブラリーを作製した。

アンチセンスプライマーemp P3、センスプライマーemp P4、アダプターDNAの塩基配列を、それぞれ、配列番号23、24、25に示す。また、これらをまとめて図25に示す。

次いで、このプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31ゲノムのアダプターDNAライブラリーを鑄型に用いてPCRを行い、emp遺伝子全長を含むDNA断片を増幅した。更に、得られたPCR増幅産物のダイレクトシーケンスによりemp遺伝子のDNA配列を決定した。

このプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31株由来の細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子empのDNA配列を配列番号3(図9～11の上段)に示す。また、そのDNA配列に対応する細胞外主要タンパク質分解酵素EMPのアミノ酸配列を配列番号4(図9～11の下段)に示す。

(8-4) EMPの性状

細胞外主要タンパク質分解酵素EMPは、プレプロ構造として754アミノ酸残基からなる分子量約84kDaの酸性タンパク質であり、細胞外に分泌される際にN末端124アミノ酸残基が切断され、630アミノ酸残基からなる分子量約71kDaの構造体へと成熟すると推定した。成熟体のN末端から207番目にはZincメタロタンパク質分解酵素の亜鉛イオンの配位に関与するとされるHEXXH配列が存在することから、EMPはZincメタロタンパク質分解酵素であると推定した。

EMPはClostridium acetobutylicumのメタロタンパク質分解酵素とアミノ酸レベルで37%の相同性を有していた。

実施例9

(*i mp* 遺伝子と *e mp* 遺伝子が不活性化されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株の作製)

次いで、実施例7で得たブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2を親株に *e mp* 遺伝子の不活性化を行い、2種のタンパク質分解酵素 *i mp* と *e mp* 遺伝子が不活性化されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株を作製した。*e mp* 遺伝子が不活性化されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株の作製は、相同組み換えによる遺伝子の不活性化法に準じて行った。

まず、*e mp* 遺伝子不活性化用ベクターの構築を行った。上記の実施例8-3に記載の *e mp* P4プライマー（配列番号24）とアダプタープライマー（配列番号25）をプライマーに、そして、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のアダプターゲノムDNAライプラリーを鋳型に用いてPCRを行い、*e mp* 遺伝子を部分的に含む約2.2kbのDNA断片を増幅した。

次いで、このPCRにより増幅された約2.2kbのDNA断片をpUC118のHincII制限酵素切断部位に挿入した。次いで、挿入したDNA断片の近傍にあるBamHI認識配列に同制限酵素により切り出されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を挿入した。更に、制限酵素HindIIIとPstIで*e mp* 遺伝子内部の220bpを除去後、このプラスミドのHindIII/PstI制限酵素切断部位にネオマイシン耐性遺伝子を含みFRT配列を両側に持つDNA断片を挿入することにより*e mp* 遺伝子不活性化用ベクターを構築した。この*e mp* 遺伝子不活性化用ベクターをpBlue-*e mp* ::Nm^rとした。

次いで、この*e mp* 遺伝子不活性化用ベクター pBlue-*e mp* ::Nm^r を用いてブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2の*e mp* 遺伝子の不活性化を行った。pBlue-*e mp* ::Nm^r を用いた*e mp* 遺伝子の不活性化、及び、*e mp* 遺伝子不活性化株ゲノム上のネオマイシン耐性遺伝子の除去は、上記実施例7に記載の*i mp* 遺伝子不活性化株の構築と同様の手順により行った。

上記により得た*i mp* 遺伝子及び*e mp* 遺伝子が不活性化されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株をブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 (Brevibacillus choshinensis HPD31-

S P 3) と命名し、F E R M B P - 0 8 4 7 9 として国際寄託した。
(プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 が胞子形成能を有しないことの確認)

実施例 10

(耐熱性試験)

以上により得たプレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-S P 3 が胞子形成能を有していないことを確認するため、実施例 2 と同様の方法により菌体の耐熱性試験を行った。試験の対照にはプレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 を用いた。その結果を表 4 に示す。

(表 4)

菌 株	生 菌 数	
	80°C 加温前	80°C 加温後
プレビバチルス・ チョウシネンシス HPD31	7. 6 × 10 ⁷	1. 9 × 10 ⁷
プレビバチルス・ チョウシネンシス HPD31-S P 3	2. 1 × 10 ⁷	0

プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 は、80°C、10 分間の加温により全菌数の約 3/4 が死滅するのに対し、プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-S P 3 は同条件によって完全に死滅する。つまり耐熱性胞子を形成しないことが示された。

実施例 11

(D 値の測定)

更に、プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-S P 3 の胞子形成能を

解析するため実施例3と同様の方法により菌体のD値の測定を行った。試験の対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。その結果を表5に示す。

(表5)

	D値 (分間)		
	60°C	70°C	80°C
プレビバチルス・			
チョウシネンシスHPD31	330	94	67
プレビバチルス・			
チョウシネンシスHPD31-SP3	ND	ND	ND

表5に示すとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31については、各温度域での菌体のD値を求めることができた。しかしながら、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3については、各温度域での試験開始後、1分間以内にすべての菌体が死滅したため、いずれの温度域でも菌体のD値を求めることができなかった。この結果は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3が胞子体を形成しなかったためであると考えられる。

以上の80°C、10分間の恒温試験及びD値の測定試験の結果により、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3は、胞子形成能を有しないことが示された。

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

更に、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解活性の評価を行った。

まず、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087) (バチルス・プレビスH102 (Bacillus brevis H1

02) (特開昭63-56277)) では分解が観察されないミルクカゼイン及びBSAに対して、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3が分解性を示さないことを確認した。

実施例12

(ミルクカゼインの分解試験によるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

5%、2%、1%のスキムミルクを含むTM寒天平板培地のそれぞれにブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を植菌した後、37°Cで3日間培養を行い、ミルクカゼインの分解によるコロニーの周囲のハロー形成の有無を観察した。その結果、5%、2%、1%のスキムミルクを含む、それぞれのTM寒天培地のすべてにおいてハローは全く形成されなかった。

この結果により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3は、ミルクカゼインの分解性を有しないことが確認された。

実施例13

(BSAの分解試験によるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

無菌濾過したBSA (Sigma A4503) 溶液を終濃度3.2mg/mlになるように添加したTM液体培地10mlにブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を接種し、37°C、200rpmで振とう培養した。

培養濾液を、培養開始後24時間、48時間、72時間の各々の時点で採取し、採取した各々の培養濾液に対して10000rpmで5分間遠心分離を行った。次いで、遠心分離により得られた培養上清画分625μlに0.5M Tris-HCl (pH 6.8) 125μl、10% SDS 200μl、β-メルカプトエタノール 50μlを添加し、攪拌後沸騰水中で3分間熱処理を行った。更に熱処理後、0.05% BPPと70%グリセロールを含む0.0625M Tris-HCl (pH 6.8) 0.1mlを加えSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。なお、SDS-PAGEは10%のア

クリルアミド濃度で行なった。タンパク質の検出は、CBB（クーマシブリリアントブルー）による染色により行った。その結果、培養開始後24時間、48時間、72時間の全てにおいてBSAの分解によるバンドは観察されなかった。

この結果により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3はBSAの分解性を有しないことが確認された。

更に、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性をゼラチーン-PAGE法及びアゾカゼイン、アゾコールを用いた方法により測定した。対照にはブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087) を用いた。

実施例14

(ゼラチーン-PAGEによるHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれをTM液体培地で48時間培養した後、培養上清画分10μlをゼラチーン-PAGEに供した。ゼラチーン-PAGEは、Analytical Biochemistry 102, 196-202 (1980) の方法に従い行った。電気泳動後のゲルを10mM CaCl₂を含む50mMトリス塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中に、37°Cの恒温に16時間置くことによりゲル内のゼラチーンを分解させた。恒温に置いた後、0.1%アミドブラックと30%メタノールと10%酢酸からなる染色液で30分間染色し、アミドブラックを含まない同液で脱色した。その結果を図2に示す。

図2に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の培養上清画分では、約40kDaの移動度にタンパク質分解活性によりゼラチーンが分解されたことを示すクリアバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の培養上清画分においては、ゼラチーンの分解を示すクリアバンドは全く認められなかった。

実施例15

(アゾカゼインを使用したH P D 3 1 - S P 3 の細胞外のタンパク質分解酵素活性の測定)

プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 及びプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3 をT 2 培地 (ペプトン1%、肉エキス0. 5%、酵母エキス0. 2%、グルコース1%) で、30°C、6日間振盪培養した。培養液を10, 000 r p m 、10分間遠心分離し、得られた上清を活性測定用の試料とした。5 g のアゾカゼインを0. 1 M のT r i s - H C l (p H 8. 0) 1 L に溶かし、基質溶液とした。次いで、0. 1 m l の上記基質溶液にこれと等量の試料を加え、37°Cで5時間反応させた後、0. 2 m l の10%トリクロロ酢酸溶液を加えて反応を止めた。次いで、室温で20分間静置した後、15, 000 r p m で10分間遠心分離して上清画分をとり、0. 4 m l の0. 5 N NaOHを加え、440 n m の吸光度を測定した。以上の実験の結果を表6に示す。なお、表6では5時間の反応で吸光度を10変化させる酵素活性を1 u n i t とした。

(表6)

菌 株	酵 素 活 性 (units/ml of culture supernatant)
プレビバチルス・ チョウシネンシスH P D 3 1	0. 1 2
プレビバチルス・ チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3	ND

ND : 検出不可能 (0. 001以下)

上記の表6に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3 では、アゾカゼイン試薬を用いた活性測定でもタンパク質分解酵素活性を検出できなかった。プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3 の培養上清画分のタンパク質分解酵素活性はプレビバチルス・チョウシネンシ

スH P D 3 1に比べて1／120以下であった。

実施例16

(アゾコールを使用したH P D 3 1－S P 3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の測定)

プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1及びプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1－S P 3のそれぞれをTM液体培地で48時間培養し、培養終了後、培養液を遠心、分画して得たそれぞれの培養上清画分をC e n t r i c on p l.u s - 2 0 (Bi o m a x - 5)により10倍に濃縮した。次いで、濃縮上清液300μlと等量の100mMトリス塩酸(pH 7.5)、10mM C a C l₂、1%アゾコール溶液を混合し、37℃の恒温で3時間、攪拌した。反応終了後、反応液を直ちに遠心分離し、培養上清液の520nmの吸光度を測定することにより、酵素活性を測定した。その結果を表7に示す。なお、37℃、1時間の反応で520nmの吸光度を0.01上昇させる酵素量を1 unitとした。

(表7)

菌 株	酵 素 活 性 (units/ml of culture supernatant)
プレビバチルス・	
チョウシネンシスH P D 3 1	33.2
プレビバチルス・	
チョウシネンシスH P D 3 1－S P 3	ND

ND : 検出不可能 (0.1以下)

上記の表7に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1－S P 3では、アゾコール試薬を用いた活性測定でもタンパク質分解酵素活性を検出できなかった。プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1－S P 3

の培養上清画分のタンパク質分解酵素活性はプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31に比べて1/330以下であった。

以上の実施例14から実施例16により、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性が、公知の菌株であるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31より格段に低減していることが示された。

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内タンパク質分解酵素活性の評価)

次いで、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内のタンパク質分解酵素活性をゼラチン-PAGE法及びアゾカゼインを用いた方法により評価を行った。なお、対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

実施例17

(未変性条件下でのゼラチン-PAGEによるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内タンパク質分解酵素活性の評価)

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれをTM液体培地で、30°Cで48時間培養した。培養終了後、遠心分離により培養液から菌体を回収した後、超音波により菌体を破碎し、更に、遠心分離を行うことで細胞内画分を得た。そして、この細胞内画分を未変性条件下で電気泳動に供した。未変性条件下の電気泳動は、細胞内画分10μlに終濃度50mMトリス塩酸(pH6.8)、10%グリセロールを加え、0.1%のゼラチンを含む10%アクリルアミドゲルに供し、SDSを含まないトリスグリシン緩衝液で4°C、10mAの定電流で10時間泳動することにより行った。

電気泳動終了後、50mMトリス塩酸(pH7.5)、10mMCaCl₂緩衝液中でアクリルアミドゲルを37°Cの恒温に24時間置いた後、0.1%アミドブラックと30%メタノールと10%酢酸からなる染色液で30分間染色し、

アミドブロックを含まない同液で脱色した。その結果を図3に示す。

図3に示されるとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の細胞内画分では、タンパク質分解活性によりゼラチンが分解されたことを示すクリアバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内画分においては、ゼラチンの分解を示すクリアバンドは全く認められなかった。

実施例18

(アゾカゼインを使用したブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内のタンパク質分解酵素活性の測定)

実施例17と同様の方法で得たブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3、それぞれの細胞内画分200μlと酵素反応液(100mMトリス塩酸(pH7.5), 0.2%アゾカゼイン, 10mM CaCl₂)400μlを混和し、37°Cの恒温に1.5時間置いた後、終濃度2.5%のTCAを添加することにより反応を停止させた。次いで、反応液を遠心分離後、上清液の440nmの吸光度を測定した。反応に用いた粗酵素液の総タンパク質量は、BSAを標準とするBradford法により定量した。以上の結果を表8に示す。なお、37°C、1時間の反応において440nmの吸光度を0.01上昇させる酵素量を1unitとした。

(表8)

菌 株	比活性(units/mg protein)
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	41.5 (±1)
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	5.2 (±1.4)

上記の表8が示すとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3では、細胞内のタンパク質分解酵素活性が、ブレビバチルス・チョウシネン

シスHPD31に比べ約1/8に低下していた。

以上の実施例17及び実施例18により、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内のタンパク質分解酵素活性は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31より格段に低減していることが示された。

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3による組換えタンパク質の分泌生産)

更に、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた組換えタンパク質の生産性及び分解性の評価試験を、まず、組換えタンパク質が分泌生産される場合について行った。

この組換えタンパク質が分泌生産される場合の生産性及び分解性の評価試験は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主として分泌生産を行った場合には、その一部が分解されていたタンパク質の生産を行うことにより行った。

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主として分泌生産を行った場合にその一部分が分解されていたタンパク質としては、ブタ由来IL-1 β 成熟体 (EMBL accession X74568)、大腸菌K12株由来マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein) 成熟体 (EMBL accession AAB59056)、ウシ由来マクロファージコロニー刺激因子成熟体 (GenBANK accession NM_174026.1)、豚丹毒抗原タンパク質の一部分で豚丹毒抗原性を有するEN2 (特開2000-279179)、及び、大腸菌O157:H7株由来のインチミン (SWISS-PROT accession P43261) の一部分でインチミン抗原性を有するポリペプチド (Intimin (339-575)) を用いた。なお対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

実施例19

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるブタIL-1 β タンパク質の分泌生産)

ブタ由来IL-1 β 成熟体 (EMBL accession X74568)

(以下ブタ IL-1 β) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にNco I認識配列とシグナルペプチドの一部をコードする配列を付加したセンスプライマー(配列番号26:図26)とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHind III認識配列を付加したアンチセンスプライマー(配列番号27:図27)を用いてブタ由来IL-1 β cDNAを鑄型にPCRを行った。更に、PCRで増幅されたDNA断片を制限酵素Nco IおよびHind IIIで処理し、p NY301ベクターのNco I/Hind III制限酵素切断部位に挿入することによりブタIL-1 β 分泌生産用ベクターを構築した。このブタIL-1 β 分泌生産用ベクターをp NY301-p IL-1 β とした。

次いで、このp NY301-p IL-1 β をエレクトロポレーション法によりプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30°C、90時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得たそれぞれの培養上清画分を10-25%濃度勾配のアクリルアミドゲル電気泳動に供した。電気泳動終了後、セミドライ式タンパク質転写装置によってタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。次いで、定法に従い、転写膜を抗p i g IL-1 β 抗体を用いたウエスタンプロット解析に供しブタIL-1 β の検出を行った。

その結果、図5に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、ブタIL-1 β の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、ブタIL-1 β の分解を示すバンドは認められなかつた。

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、ブタIL-1 β に相当するバンドのデンシティメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたブタIL-1 β の定量を行った。この測定の結果を図4及び表9に示す。

(表9)

宿主菌株	培養液中のブタIL-1 β の蓄積量 (mg/1)
ブレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31	30
ブレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31-SP3	80

表9に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のブタIL-1 β の蓄積量は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5を宿主に用いた場合に比べ約2.5倍以上に増加していた。

実施例20

(ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3による大腸菌MBPの分泌生産)

大腸菌K12株由来マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein (MBP)) 成熟体 (EMBL accession AB59056) (以下大腸菌MBP) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にPstI認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号28:図28) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHindIII認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号29:図29) を用いて大腸菌K12株ゲノムDNAを鑄型にPCRを行った。更に、PCRで増幅されたDNA断片を制限酵素PstIとHindIIIで処理し、pNY301ベクターのPstI/HindIII制限酵素切断部位に挿入することにより大腸菌MBP分泌生産用ベクターを構築した。この大腸菌MBP分泌生産用ベクターをpNY301-MBPとした。

次いで、このpNY301-MBPをエレクトロポレーション法により、ブレ

ビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 及びプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3 のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30°C、72時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンプロット分析に供した。その結果、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 を宿主に用いた場合には、大腸菌MBPの分解を示す顕著なバンドが確認されたが、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3 を宿主に用いた場合には、大腸菌MBPの分解を示すバンドは認められなかった。

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、大腸菌MBPに相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積された大腸菌MBPの定量を行った。この測定の結果を表10に示す。

(表10)

宿主菌株	培養液中の大腸菌MBPの蓄積量 (mg/1)
プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1	500
プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3	900

表10に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3 を宿主に用いて生産された培養液中の大腸菌MBPの蓄積量は、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

実施例21

(プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1 - S P 3によるウシM-CSF

の分泌生産)

ウシ由来マクロファージコロニー刺激因子成熟体 (GenBANK accession NM_174026.1) (以下ウシM-CSF) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にBamHI認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号30:図30) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHindIII認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号31:図31) を用いてウシM-CSF cDNAを鑄型にPCRを行った。更に、PCRで増幅されたDNA断片を制限酵素BamHIとHindIIIで処理し、pNY301ベクターのBamHI/HindIII制限酵素切断部位に挿入することによりウシM-CSF分泌生産用ベクター構築をした。このウシM-CSF分泌生産用ベクターをpNY301-M-CSFとした。

次いで、このpNY301-M-CSFをエレクトロポレーション法によりブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30°C、72時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンプロット分析に供した。その結果、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、ウシM-CSFの分解を示すバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、ウシM-CSFの分解を示すバンドは認められなかった。

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、ウシM-CSFに相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表11に示す。

(表11)

宿主菌株	培養液中のウシM-CSFの蓄積量 (mg/1)
プレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31	50
プレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31-SP3	150

表11に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のウシM-CSFの蓄積量は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約3倍に増加していた。

実施例22

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるEN2の分泌生産)

豚丹毒抗原タンパク質の一部分であるEN2を発現するプラスミドベクターpNH300_en2(特開2000-279179)をエレクトロポレーション法により、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築し、更に、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30°C、90時間培養した。

培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンプロット分析に供した。その結果、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、EN2の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、EN2の分解を示すバンドは認められなかった。

また、電気泳動後のゲルに対してC B B染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、E N 2に相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表12に示す。

(表12)

宿主菌株	培養液中のE N 2の蓄積量 (mg/1)
プレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31	400
プレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31-SP3	750

表12に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のE N 2の蓄積量は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

実施例23

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるIntimin (339-575)の生産)

成熟型インチミンの339番目のアミノ酸配列に相当するDNA配列にB a m H Iの認識配列を付加したセンスプライマー（配列番号3-2：図32）と575番目近傍のアミノ酸配列に対応するDNA配列にH i n d IIIの認識配列を付加したアンチセンスプライマー（配列番号3-3：図33）を用いてインチミン遺伝子を鑄型にP C Rを行った。更に、P C Rで増幅したDNA断片を制限酵素H i n d IIIとB a m H Iで処理した後、p N Y 3 0 1のB a m H I / H i n d III制限酵素切断部位に挿入することにより大腸菌O 1 5 7 : H 7株由来のインチミン (S W I S S - P R O T a c c e s s i o n P 4 3 2 6 1) のアミノ酸配

列の339番目から575番目に相当する部分のポリペプチド（以下Intimin（339-575））を発現するプラスミドベクターを構築した。このIntimin（339-575）分泌生産用ベクターをpNY301-Intiminとした。

次いで、このpNY301-Intiminをエレクトロポレーション法により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。更に、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30°C、90時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンプロット分析に供した。その結果、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、Intimin（339-575）の分解を示す複数の顕著なバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、Intimin（339-575）の分解を示す顕著なバンドは認められなかった。

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、Intimin（339-575）に相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたIntimin（339-575）の定量を行った。この測定の結果を表13に示す。

（表13）

宿主菌株	培養液中のIntimin（339-575）の蓄積量（mg/l）
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	100
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	200

表13に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31

—S P 3を宿主に用いて生産された培養液中のIntimin (339-575)の蓄積量は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

以上の実施例19から実施例23により、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、その生産された一部が分解されていた組換えタンパク質の分泌生産をプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31—S P 3を宿主に用いて行った場合、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合より該タンパク質の蓄積量が増加することが示された。

これらの結果は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31—S P 3を宿主に用いた場合には、分泌生産されたタンパク質の分解が顕著に抑制されたためと考えられる。

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31—S P 3による組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産)

更に、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31—S P 3を宿主に用いた組換えタンパク質の生産性及び分解性の評価試験を、組換えタンパク質が分泌生産される場合ではなく、生産された組換えタンパク質が菌体内に蓄積される場合について行った。この評価試験は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いて菌体内への蓄積生産を行った場合に、その一部が菌体内で分解されていたタンパク質であるブタ由来インターフェロン- γ (PIR accession S10513) 及びイヌ由来インターフェロン- β (GenBANK accession E11229) の生産を行うことにより行った。

なお、対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

実施例24

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31—S P 3による組換えブタ由来インターフェロン- γ の細胞内への蓄積生産)

ブタ由来インターフェロン- γ 成熟体 (PIR accession S10513) (以下ブタIFN- γ) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列

にN c o I 認識配列とM e t A 1 a をコードする配列からなるc c a t g g c t 配列を付加したセンスプライマー（配列番号3 4：図3 4）とC末端アミノ酸残基をコードするD N A配列にH i n d III 認識配列を付加したアンチセンスプライマー（配列番号3 5：図3 5）を用いてブタ由来インターフェロン- γ c D N Aを鑄型にP C Rを行った。更に、P C Rで増幅したD N A断片を制限酵素N c o I とH i n d III で処理した後、p N Y 3 0 1ベクターの翻訳開始メチオニン上に存在するB s p H I / H i n d III 制限酵素切断部位に挿入することによりブタI F N- γ 発現用ベクターを構築した。このブタI F N- γ 発現用ベクターをp N Y 3 0 1-p I F N- γ とした。このp N Y 3 0 1-p I F N- γ は分泌シグナルペプチドをコードするD N A配列を有していないため生産されたブタI F N- γ は細胞内に蓄積される。

次いで、このp N Y 3 0 1-p I F N- γ をエレクトロポレーション法によりプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1及びプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1-S P 3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。また、対照として用いるためブタI F N- γ 遺伝子が組み込まれていないp N Y 3 0 1を導入したプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1/p N Y 3 0 1も構築した。

更に、これらの形質転換体及びプレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1/p N Y 3 0 1を、それぞれTM液体培地で3 0 °C、7 2時間培養した。培養終了後、遠心分離により培養液から菌体を回収した後、超音波により菌体を破碎し、更に、遠心分離を行い細胞内画分を得た。次いで、この細胞内画分を実施例1 9と同様の手順によりS D S-P A G E及びウエスタンプロット分析に供した。

その結果、図6に示されているように、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1を宿主に用いた場合には、ブタI F N- γ の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、プレビバチルス・チョウシネンシスH P D 3 1-S P 3を宿主に用いた場合には、ブタI F N- γ の分解を示すバンドは認められなかった。

また、電気泳動後のゲルに対してC B B染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、ブタI F N- γ に相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより細胞内に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表1

4に示す。

(表14)

宿主菌株	細胞内のブタIFN- γ の蓄積量 (mg/1)
ブレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31	30
ブレビバチルス・	
チョウシネンシスHPD31-SP3	60

表14に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産されたブタIFN- γ の細胞内の蓄積量は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

実施例25

(ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるイヌ由来インターフェロン- β の細胞内への蓄積生産)

イヌ由来インターフェロン- β 成熟体(GenBANK accession E11229) (以下イヌIFN- β) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にBspHI認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号36:図36) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHindIII認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号37:図37) を用いてイヌIFN- β cDNAを鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅したDNA断片を制限酵素BspHI及びHindIIIで処理した後、pNY301ベクターの翻訳開始メチオニン上に存在するBspHI/HindIII制限酵素切断部位に挿入することによりイヌIFN- β 発現用ベクターを構築した。このイヌIFN- β 発現用ベクターをpNY301-cIFN- β とした。このpNY301-cIFN- β は分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列を有していないため生産され

たイヌ IFN- β は細胞内に蓄積される。

次いで、この pNY301-cIFN- β をエレクトロポレーション法によりプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれ TM 液体培地で 30°C、72 時間培養した。培養終了後、遠心分離により培養液から菌体を回収した後、超音波により菌体を破碎し、更に、遠心分離を行うことで細胞内画分を得た。次いで、この細胞内画分を実施例 21 と同様の手順により SDS-PAGE 及びウエスタンプロット分析に供した。その結果、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 を宿主に用いた場合には、イヌ IFN- β の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 を宿主に用いた場合には、イヌ IFN- β の分解を示すバンドは認められなかった。

また、電気泳動後のゲルに対して CBB 染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、イヌ IFN- β に相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより、細胞内に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表 15 に示す。

(表 15)

宿主菌株	細胞内のイヌ IFN- β の蓄積量 (mg/1)
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	50
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	80

表 15 に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 を宿主に用いて生産されたイヌ IFN- β の細胞内の蓄積量は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 を宿主に用いた場合に比べ約 1.6 倍に増加していた。

上記の実施例24及び実施例25により、本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて組換えタンパク質の生産を行った場合、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ、該タンパク質の蓄積量が増加することが示された。これらの結果は、細胞内タンパク質分解酵素遺伝子impの不活性化により細胞内に蓄積された組換えタンパク質が顕著に抑制されたためであると考えられる。

寄託番号：FERM BP-08497

寄託の表示：Brevibacillus choshinensis HPD
31-SP3

寄託機関の名称：独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市

東1丁目1番地1 中央第6

寄託の日付：平成15年（2003）9月11日

寄託番号：FERM BP-6863

寄託の表示：Brevibacillus choshinensis HPD
31 (FERM BP-1087)

寄託機関の名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市

東1丁目1番3号

寄託の日付：平成11年（1999）8月31日

寄託番号：FERM BP-6623

寄託の表示：Bacillus brevis HPD31-SP5

寄託機関の名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市

東1丁目1番3号

寄託の日付：平成11年（1999）1月19日

請求の範囲

1. 孢子を形成しないプレビバチルス・チョウシネンシス。
2. 下記の菌学的性質を有し、孢子を形成しないプレビバチルス・チョウシネンシス。

(a) 形態

細胞の大きさ

液体培地: 0.4~0.6 × 1.5~4 μm

細胞の形 桧菌

胞子の有無 無

(b) 生理学的性質

硝酸塩の還元 —

VPテスト —

クエン酸の利用 +

ウレアーゼ —

オキシダーゼ +

カタラーゼ +

(c) 他の性質

温度抵抗性 60°Cで死滅する。

3. 孢子形成関連遺伝子 $h\circ s$ が不活性化されたこと、を特徴とする孢子を形成しないプレビバチルス・チョウシネンシス。

4. 孢子形成関連遺伝子 $h\circ s$ の塩基配列が配列番号 1 に示す配列であること、を特徴とする請求項 3 に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス。

5. 孢子を形成せず、且つ、細胞外及び/又は細胞内のタンパク質分解酵素活性が低減ないし消失したプレビバチルス・チョウシネンシス。

6. 下記の菌学的性質を有し、孢子を形成しないプレビバチルス・チョウシネンシス。

(a) 形態

細胞の大きさ

液体培地: 0. 4~0. 6 × 1. 5~4 μ m

細胞の形 桿菌

胞子の有無 無

(b) 生理学的性質

硝酸塩の還元 一

VP テスト 一

クエン酸の利用 +

ウレアーゼ 一

オキシダーゼ +

カタラーゼ +

(c) 他の性質

温度抵抗性 60 °C で死滅する。

細胞外のタンパク質分解酵素活性 低いないしなし

細胞内のタンパク質分解酵素活性 低いないしなし

7. 細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 emp が不活性化されたこと、を特徴とするプレビバチルス・チョウシネンシス。

8. 細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 emp の塩基配列が配列番号 3 に示す配列であること、を特徴とする請求項 7 に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス。

9. 細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 imp が不活性化されたこと、を特徴とするプレビバチルス・チョウシネンシス。

10. 細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 imp の塩基配列が配列番号 5 に示す配列であること、を特徴とする請求項 9 に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス。

11. 細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 emp 及び細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 imp が不活性化されたこと、を特徴とするプレビバチルス・チョウシネンシス。

12. 胞子を形成しないこと、を特徴とする請求項 11 に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス。

13. プレビバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 - S P 3 (F E R M B P - 0 8 4 7 9) 。

14. 請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のプレビバチルス・チョウシネンシスを、タンパク質をコードする遺伝子を組込んだ発現ベクターにより形質転換してなるプレビバチルス・チョウシネンシス。

15. 請求項 14 に記載のプレビバチルス・チョウシネンシス形質転換体を培養する工程を含むこと、を特徴とするタンパク質の製造方法。

16. 請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のプレビバチルス・チョウシネンシスを組換えタンパク質生産の宿主として使用すること、を特徴とする組換えタンパク質を製造する方法。

図 1

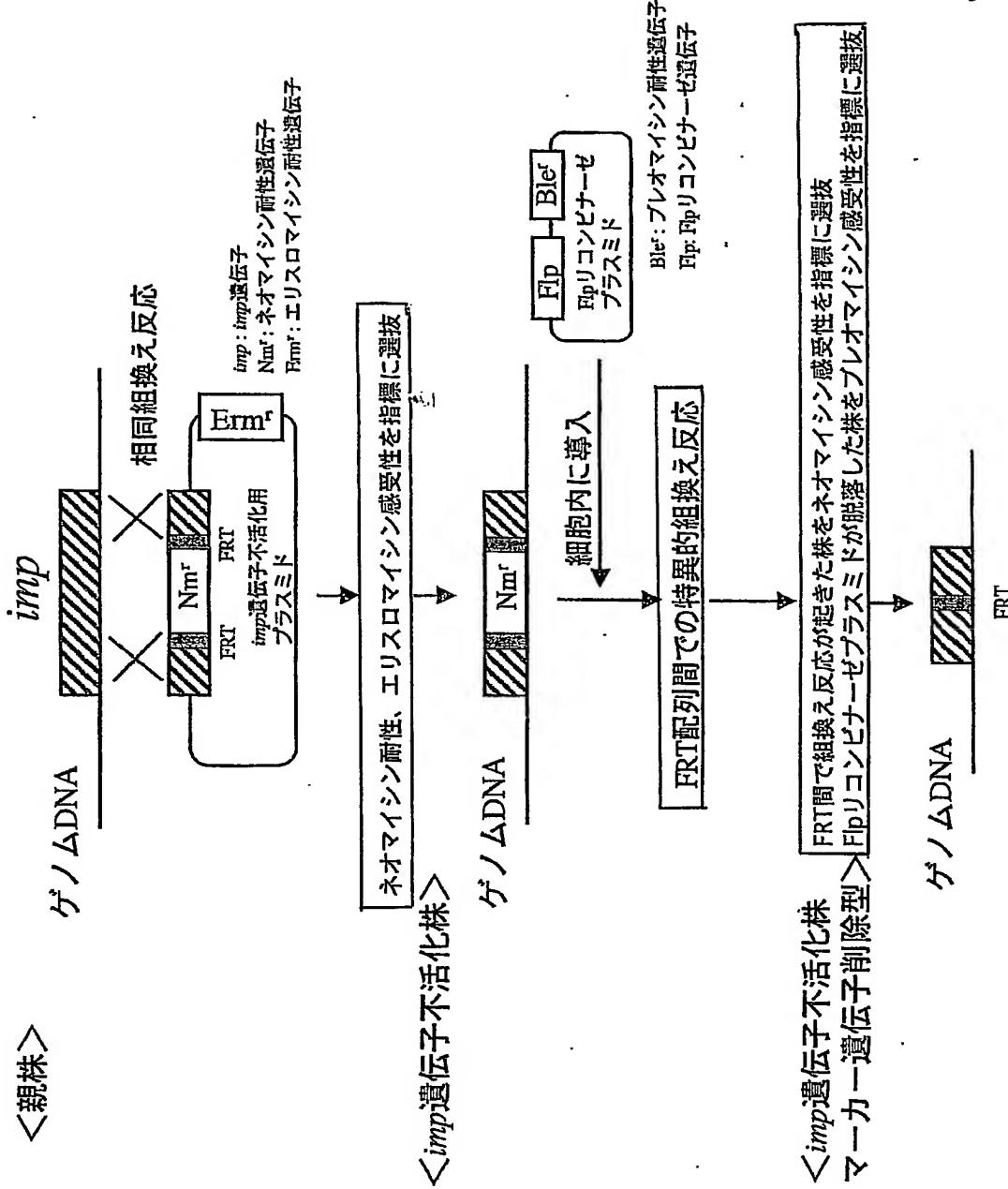


図2

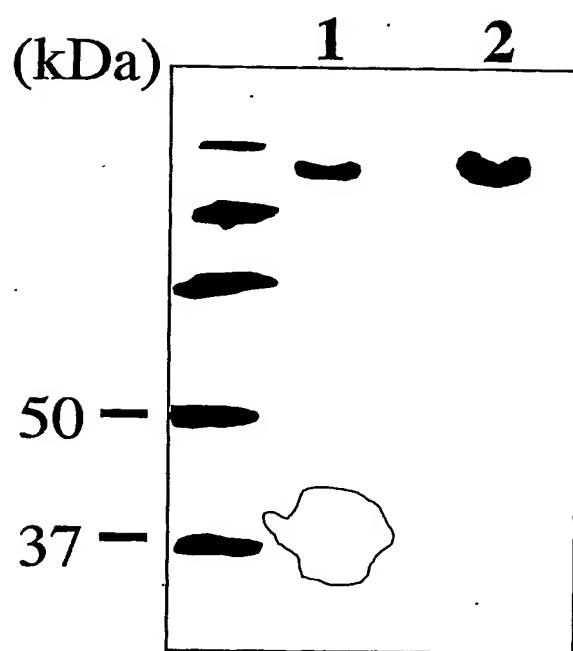


図3

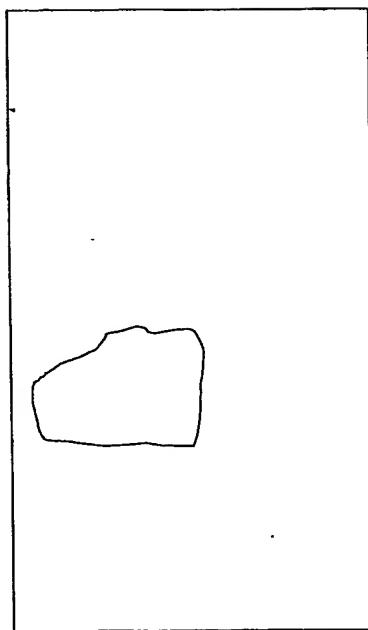


図4

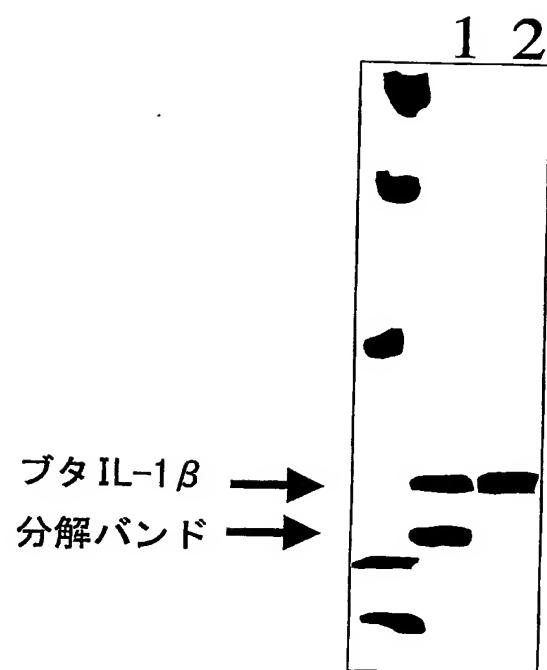


図5

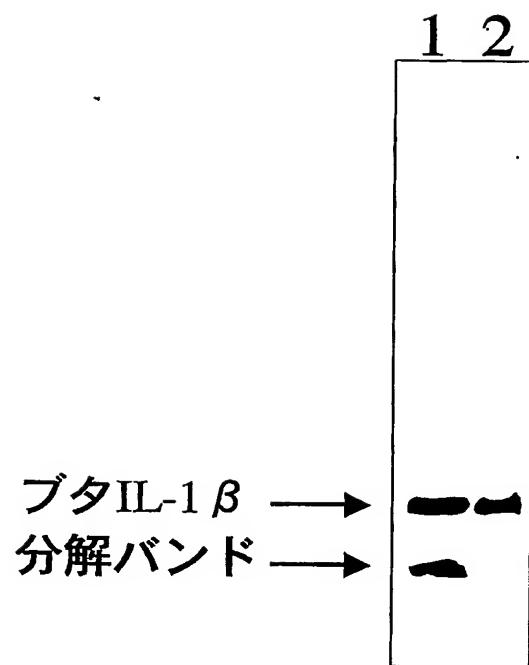


図6

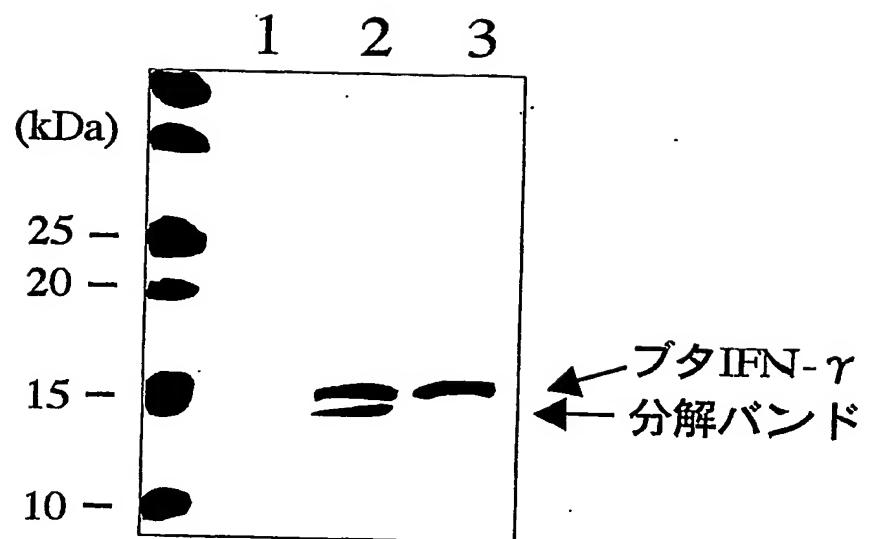


図 7

hos

1 ATGGGTGCCGATATCAAAATGCGAGTCACCATTGACCAATGACCAAGTGAAAGAT 60
 MetGlyAlaAspIleLysAsnAlaSerGlnProPheLeuThrAsnAspGlnValLysAsp

61 TTGATAGCCAAGAGCCAAGCTGGCGATACGGATGCACGTGAGCTTCTCGTGAATAGCAAT 120
 LeuIleAlaLysSerGlnAlaGlyAspThrAspAlaArgGluLeuLeuValAsnSerAsn

121 ATCAGACTGGCTGGTCCGTCGTCCAGCGTTTATCAACCGCGGGTATGAAGCGGATGAT 180
 IleArgLeuValTrpSerValValGlnArgPheIleAsnArgGlyTyrGluAlaAspAsp

181 TTGTTTCAGATCGGTTGCATTGGCTTGCCTAAGGCCGTTGACAAGTTCGATCTTCGTAC 240
 LeuPheGlnIleGlyCysIleGlyLeuLeuLysAlaValAspLysPheAspLeuSerTyr

241 GATGTGAGATTTCGACCTATGCGGTGCCAATGATCATCGGAGAAATTCAACGCTTTTG 300
 AspValArgPheSerThrTyrAlaValProMetIleGlyGluIleGlnArgPheLeu

301 CGCGATGACGGTACGGTTAAGGTCAAGTCAGTCGATCGTAAAGAACAGCGAATAAGGTGCGG 360
 ArgAspAspGlyThrValLysValSerArgSerLeuLysGluThrAlaAsnLysValArg

361 CGATCAAAGGATGAATTGTACAAGCAATTGGCCGTGCCCCACGATCGCAGAAGTGGCA 420
 ArgSerLysAspGluLeuTyrLysGlnPheGlyArgAlaProThrIleAlaGluValAla

421 GAAGCAGTGGGAATCACGCCGGAGGAAGTAGTCGGCAAGAGGCAAGCAGAGCGCCT 480
 GluAlaValGlyIleThrProGluGluValValPheAlaGlnGluAlaSerArgAlaPro

481 TCCTCCATCCATGAGACCGTTTGAAAATGACGGCGATCCCATCACACTGATCGATCAG 540
 SerSerIleHisGluThrValPheGluAsnAspGlyAspProIleThrLeuIleAspGln

541 ATAGCGGATGAAGGTGTGAACAAGTGGTTGAGAAAATTGCCTTGAAGGACGCCATCAGC 600
 IleAlaAspGluGlyValAsnLysTrpPheGluLysIleAlaLeuLysAspAlaIleSer

601 AGGCTGAGCGAGCGTGGACGCTCATCGTCTACCTGCGCTATTACAAGGATCAGACACAG 660
 ArgLeuSerGluArgGluGlnLeuIleValTyrLeuArgTyrTyrLysAspGlnThrGln

661 TCTGAGGTAGCAGAGCGTCTAGGGATTTCGCAGGTCCAGGTCTCGCGTCTGGAAAAGCGT 720
 SerGluValAlaGluArgLeuGlyIleSerGlnValGlnValSerArgLeuGluLysArg

図 8

721 ATCCTGCTAACGATCAAGGAGCAAATTGAACATTAG 756
IleLeuLeuThrIleLysGluGinIleGluHis***

☒ 9

emp

1 GTAACGCAGTGAAGAAAGGCAAGAAGCTATTATCCATCCTATTTCTTCCTCACTGGTC 60
 ValAsnAlaValLysLysGlyLysLysLeuLeuSerIleLeuPheSerSerSerLeuVal

61 CTGAGCGGCATTGCGCGGTTCCAGCGACAGGGATGGCCAAGTCAAAGGACAAGCCGCCG 120
 LeuSerGlyIleAlaAlaValProAlaThrGlyMetAlaLysSerLysAspLysProPro

121 CTTGAAGTGGATTGTCCACAGTGAACATGGATCGTTGGTTAAAGCCTTGATCGACCAA 180
 LeuGluValAspLeuSerThrValAsnMetAspArgLeuValLysAlaLeuIleAspGln

181 GGTGAAATCGACGAGGACGCCGACCAGGAAGAGATCAACAAAGCTGTGGAGAAGTTTG 240
 GlyGluIleAspGluAspAlaAspGlnGluGluIleAsnLysAlaValGluLysPheLeu

241 AGAGACAAGAAAGTTCCCCACGGCATTGATGACTCCAGCTCCTCGGGAAAAAGCAAGC 300
 ArgAspLysLysValProHisGlyIleAspAspSerSerSerPheGlyLysLysAlaSer

301 AAAACCCAGTTCGGCAGTATCAAAGGCAGCAAGCAAAGTATCCAAGCTCAAAGATGAC 360
 LysThrGlnLeuSerAlaValSerLysAlaAlaSerLysValSerLysLeuLysAspAsp

361 AAGCAAGTGCAGCTTCCAAGCGGGTACATACGGATAATCTGGTATTGCCCTGGTCGAG 420
 LysGlnValArgAlaSerLysArgValHisThrAspAsnLeuValIleAlaLeuValGlu

421 TTCAATGATCTGGAGCACACCAGGTGCCAAACAAAGCGATTCTTGTTGGACGGCAGAC 480
 PheAsnAspLeuGluHisAsnGlnValProLysGlnSerAspSerLeuTrpThrAlaAsp

481 TTCGACCAAAAGCACTACGAGGAAATGCTGTTGATCGTAAAGGCTATACTGACTCCTGAA 540
 PheAspGlnLysHisTyrGluGluMetLeuPheAspArgLysGlyTyrThrThrProGlu

541 GGGATAAGCATGACCACGATGCCAAGTACTACTACGAGCAATCGGGTGAGACATGGACC 600
 GlyIleSerMetThrThrMetAlaLysTyrTyrGluGlnSerGlyGluThrTrpThr

601 GTGGATGGGTTGTCACTCCGTGGTTGACTGCCAAAAAGATAAGAAATTCTACGGTGGA 660
 ValAspGlyValValThrProTrpLeuThrAlaGluLysAspLysPheTyrGlyGly

661 AACGATAAAAACGGCAACGATGCCAACCCACGCGATCTGGTCGAGACACTGGATCT 720
 AsnAspGluAsnGlyAsnAspAlaAsnProArgAspLeuValValGluThrLeuGluSer

721 GTAGGGGATGCCATCAAGGGTCATGAAGAAGAACGACCAACGCCGACCCGTATGACTTG 780
 ValGlyAspAlaIleLysGlyHisGluGluGluTyrAspGlnArgAspProTyrAspLeu

781 GATGGAGACAGCGATCTGATGGAGCCGGATGGCATGCTGGACACCTGATGCTGGTCAC 840
 AspGlyAspSerAspLeuMetGluProAspGlyMetLeuAspAsnLeuMetLeuValHis

図 1 O

841 TCCGGTATTGGTGAAGAGACTGGGAAGATGCGATGCGATCTGGTCTCACCGCTGGACT 900
 SerGlyIleGlyGluGluThrGlyGluAspAlaAspAlaIleTrpSerHisArgTrpThr
 901 CTGAAAAGCCGACAGAAATTCCAGGCACCAGCCTGAAAGCTTACGACTACATGATTCA 960
 LeuLysLysProThrGluIleProGlyThrSerLeuLysAlaTyrAspTyrMetIleGln
 961 CCTGAAGATGGCGCACCCGGCGTATTGCACATGAATACGGACACAACCTGGACTGCCA 1020
 ProGluAspGlyAlaProGlyValPheAlaHisGluTyrGlyHisAsnLeuGlyLeuPro
 1021 GATCTGTATGACACGACAAGACTGGGACATGATTGCCGGTTGGCGCATGGTCGCTGATG 1080
 AspLeuTyrAspThrThrArgLeuGlyHisAspSerProValGlyAlaTrpSerLeuMet
 1081 TCTTCGGAAGCCATACAGGTAAAGATCTCCAAACCCAACCAACCGGATTGATCCTTGG 1140
 SerSerGlySerHisThrGlyLysIlePheGlnThrGlnProThrGlyPheAspProTrp
 1141 TCCAAAATGATGCTGCAGGAAATGTATGGGGCAAGTGGATTGAGCCGCAAGTCATCAAT 1200
 SerLysMetMetLeuGlnGluMetTyrGlyGlyLysTrpIleGluProGlnValIleAsn
 1201 TACGAAGACCTGAAAAACGGAAAAGCAGGCTTCGCTCTACGATGGCAGCAGCCTCGAT 1260
 TyrGluAspLeuLysLysArgLysGlnAlaSerLeuTyrAspGlySerSerLeuAsp
 1261 GAAGATGGCAAAGTCATCAAGCTGAATATGCCGCAAGTAGAGAAGACACCGCCGGTCAA 1320
 GluAspGlyLysValIleLysLeuAsnMetProGlnValGluLysThrProProValGln
 1321 CCGAAAGACGGGATTATTCTTACTTCCGATGAGGGCGACAATCTGAACACGAAGATG 1380
 ProLysAspGlyAspTyrSerTyrPheSerAspGluGlyAspAsnLeuAsnThrLysMet
 1381 ACTTCGGAAGTGATCGACCTGACAGGCCAGCTCGCATCGATGAGCTTCGACTCCTGG 1440
 ThrSerGluValIleAspLeuThrGlyAlaSerSerAlaSerMetSerPheAspSerTrp
 1441 AGAGCGATCGAGACCGGGTACGACTACCTGTACGTGAAACGTGATTGATGTCGACTCAGGT 1500
 ArgAlaIleGluThrGlyTyrAspTyrLeuTyrValAsnValIleAspValAspSerGly
 1501 GAGAGCACACAGTAAAGAGTACGATGACGAAACCAAGGCTGGATAAGGAAGAAATC 1560
 GluSerThrThrValLysGluTyrAspAspGluThrLysGlyTrpAspLysGluGluIle
 1561 AGCCTGAACGATTCGCTGGCAAAAGATTCAAGTCGAGTTCAACTACGTGACGGATGGC 1620
 SerLeuAsnAspPheAlaGlyLysLysIleGlnValGluPheAsnTyrValThrAspGly
 1621 GGCTTGGCGATGTCCGGCTTCTATCTGGATAATTTGCAGTCACAGCAGACGGCGAAGTA 1680
 GlyLeuAlaMetSerGlyPheTyrLeuAspAsnPheAlaValThrAlaAspGlyGluVal
 1681 GTCTTCTCGGATGATGCAGAAGGCGACCAGAAGTTGATCTGGATGGATTCACTCCATTTC 1740
 ValPheSerAspAspAlaGluGlyAspGlnLysPheAspLeuAspGlyPhelleHisPhe

図 1 1

1741 GACGGCGAAGGCAAAATGTACGACGCGTACTACCTGGTAGAGCTGCGCTCCCATGAAGGC 1800
AspGlyGluGlyLysMetTyrAspAlaTyrTyrLeuValGluLeuArgSerHisGluGly

1801 GTGGACGAGGGCTGAAATACTTCCGCCGCAATGACACATTCTCACGTATGATCCAGGT 1860
ValAspGluGlyLeuLysTyrPheArgArgAsnAspThrPhePheThrTyrAspProGly

1861 CTGGTGTACTGGTACTACGATGGACGCTTGGCAAAACGCAAGACAACACCAGCAAC 1920
LeuValIleTrpTyrTyrAspGlyArgPheGlyLysThrGlnAspAsnAsnThrSerAsn

1921 CATCCAGGCTACGGCATGCTGGCGTAGTCGATGCGCATCAGGAAGTTCGTTACTGGAAT 1980
HisProGlyTyrGlyMetLeuGlyValValAspAlaHisGlnGluValArgTyrTrpAsn

1981 AACGATGAGGGCAACGAGGAGGCCATTGCCGACTCCCGTTACCAAGTGAACGATGCCGCA 2040
AsnAspGluGlyAsnGluGluAlaIleAlaAspSerArgTyrGlnValAsnAspAlaAla

2041 TTCAGCCGAACAAACCTCCGGCATGGATCTGACTACATTCTCGCACGATGGATTAC 2100
PheSerProAsnLysThrSerGlyMetAspLeuAspTyrIleLeuGlyThrMetAspTyr

2101 GAGCCGCTGAAAGGCATTACCGTATTCAAAGACAGTGATGATTACACGATGCCGAAGTT 2160
GluProLeuLysGlyIleThrValPheLysAspSerAspAspTyrThrMetProGluVal

2161 CCGGAAATCGGAAAATCCTGCCGAAGATCGGTCTGCAAATCAAATTAACTCGTGTGCC 2220
ProGluIleGlyLysIleLeuProLysIleGlyLeuGlnIleLysLeuIleArgValSer

2221 AAGAAATTACGAAACGCACAGGTCGAGTTCTCCATCAAAAAATAA 2265
LysLysPheThrAsnAlaGlnValGluPheSerIleLysLys***

図 1 2

imp

1 ATGAACCACCTGATTTCGCGATCTACCCGCCTGCATGGAAGACGTAACCCTCGCTGCC 60
 MetAsnHisProAspPheArgAspLeuProAlaCysMetGluAspValThrLeuAlaAla

 61 CTGGACGAGTACACTGGTCCACCAAGATCCGACCGAATACCAATCATTGTATGGACGCTTG 120
 LeuAspGluTyrThrGlyProProAspProThrGluTyrGlnSerLeuTyrGlyArgLeu

 121 CAAGAGGTTGCCGAAACTCTCCCTCCGCTCTATCGGGAGCATGTGTATCACCCCTTTCTT 180
 GlnGluValAlaGluThrLeuProProLeuTyrArgGluHisValTyrHisProPheLeu

 181 CAAGCGATGGACAAGTTGTCTGAGTCAGGATTGCGCAGATGCTCCGTCGAGATCCTCAA 240
 GlnAlaMetAspLysLeuSerGluSerGlyPheAlaGlnMetLeuArgArgAspProGln

 241 AAAGAGCGAGAAGCCGGTCTGTTTGCATATCGCACAGGCCATTCTGCAAAACGGCGAA 300
 LysGluArgGluAlaGlyLeuPheCysAspIleAlaGlnAlaIleLeuGlnAsnGlyGlu

 301 GCGTATGAACGCGATGCCACGGATGCCTTCAGGAAGTAGTCAGCGATTGTACGACGGT 360
 AlaTyrGluArgAspAlaThrAspAlaPheGlnGluValValSerAspLeuTyrAspGly

 361 TTTTAAGCGAGGAAGACAGGAGTGGCATCAAACCGCCTGATGAAAGCTTGATTGCTCCT 420
 PheLeuSerGluGluAspArgSerGlyIleLysProProAspGluSerLeuIleAlaPro

 421 CTGGTCAAATGGGGACGCCCGCAATTGGACCTTATACGTGGACAGCTGAAGCCGCTGCC 480
 LeuValLysTrpGlyArgProGlnPheGlyProTyrThrTrpThrAlaGluAlaAlaAla

 481 CATTGGCATCAAGACGGGCATTGTCAATTGCCCGGCAAACGCCGCCTGGGTCTG 540
 HisPheGlyIleLysThrGlyIleValAsnLeuProProAlaAsnAlaArgLeuGlyLeu

 541 CTCGCGTGGCTGCATTAGGTACGAAACGGCTGGACACGACATTCTCACGCCGACACC 600
 LeuAlaTrpSerAlaLeuGlyHisGluThrAlaGlyHisAspIleLeuHisAlaAspThr

 601 GGTTTGCTTGGAGAACTGCAGCAAACCGTCTATGACGCTTGTGATGAGCTTCACAAT 660
 GlyLeuLeuGlyGluLeuGlnGlnThrValTyrAspAlaLeuPheAspGluLeuHisAsn

 661 CGGACGCTGGCGGACTACTGGTCGCTCGAATCGACGAGACTGCCTCCGACGTTGGGA 720
 ArgThrLeuAlaAspTyrTrpSerLeuArgIleAspGluThrAlaSerAspValLeuGly

 721 ATCCTGAACACCGGCCCGCTGCAGGGATTGGACTGATTGGATATTCCGGCCCTTAAT 780
 IleLeuAsnThrGlyProAlaAlaGlyIleGlyLeuIleGlyTyrPheArgGlyLeuAsn

 781 AAGGCGTACACGGACAAGCAACACTGCGGAATACAGGGCCACAGAATGACCCACATCCA 840
 LysAlaTyrThrGlyGlnAlaThrLeuArgAsnThrGlyProGlnAsnAspProHisPro

図 1 3

841 GCAGACATCTGCGCGGTTATCTTGCTGCTGAGACTGCTCGTCTGCTGCATTGACAAC 900
 AlaAspIleLeuArgGlyTyrLeuAlaAlaGluThrAlaArgLeuLeuHisPheAspAsn

 901 GCATCCGACTGGGCACAGGCACCTCTGAGGAAACCAGGCGTGTCTAAAGGCATCACA 960
 AlaSerAspTrpAlaGlnAlaLeuLeuGluGluThrArgArgAspLeuLysGlyIleThr

 961 ATAGGCAGAGCCTCTTGGATGCAGAAACCGCTCAAAATCTGCTGCCATTGTCGCTCGC 1020
 IleGlyArgAlaSerLeuAspAlaGluThrAlaGlnLysSerAlaAlaIleValAlaArg

 1021 ACAATTATGGAAGCACGCCCTGCTCAGTCAGGAAAGGTCACTGCCCTGGGCAAATTCAAAC 1080
 ThrIleMetGluAlaArgLeuLeuSerLeuGluGlyHisAlaLeuGlyGlnIleGlnAsn

 1081 TGGCACAAACGAGGATGAACGAATCGTTAGGAAATTGCTCCCATTTACAGGTTCCCTG 1140
 TrpHisAsnGluAspGluArgIleValGlnGluIleArgSerHisPheThrGlySerLeu

 1141 ACCGTGCAAGACGGCATTGTTGGGTATGTATGCTGCCATGCGTGGCAGCAGCCGTC 1200
 ThrValGlnAspGlyIleValSerGlyMetTyrAlaAlaHisValValAlaAlaAlaVal

 1201 CAAGCAGCCGTTTCAGGAGAGATGGATACTCCGCTGCCTCACAGGGATGAAAACCTG 1260
 GlnAlaAlaValSerGlyGluMetAspThrSerAlaAlaPheThrGlyMetLysThrLeu

 1261 CTGAAGAGCATGCACGACGCCAATCCTCCTGGGACCTCTCTATGTACGATATCGCGGT 1320
 LeuLysSerMetHisAspAlaAsnProSerTrpGlyProLeuTyrValArgTyrArgGly

 1321 GATCTCACTCCGCATCGCATTACTCCCGTCTGCGAGCTAG 1362
 AspLeuThrProHisArgIleTyrSerArgSerAlaSer***

図 1 4

プライマーナ

オリゴヌクレオチド配列

Hos P1	gggggIacclcacIcgIca_gcaIgcig
Hos P2	gggggatcccgccgtgattcccaactgc
Hos P3	gggctgcagatgcggatgaagggtgtg
Hos P4	gggtctagacctgcttatacacatctttcg

図15

プライマー	オリゴヌクレオチド配列
imp P1	gagagaccATGGACCATCCTGATTTCGCGATCTACCCG
imp P2	agaattcagtggtgtggtgtggtgCTCCGACAAACGGGACTAAATCCGATCC

図16

f1p P1: aaaagaattcttctgcagaacaggatgcggggagccgcccgt

図17

f1p P2: aaaaaggatccttatagcatctaattttcaacaaact

図 18

f1p P3 : aaaaaaaagatcttgaacgatgacctctaataattgttaa

図19

f1p P4: aaaagaattcaaatctagaaagtgtgtgcctgcgaggctgtc

図20

fpl P5: tccatggcacaatttgtatattatgtaaa

図21

fpl P6: - actcgagttatatgcgtctattatgttaggat

図 22

fpl P7. tttttctagactttatgaatataaagtatagtggt

図23

f1p P8: gggggctgcagttatatgcgtctattatgttaggatg

図 2 4

プライマーナ	アミノ酸配列データ	プライマーのオリゴヌクレオチド配列
cmp P1	LysArgValHisThrAspAsnLeu	aaRcgIgtNcaYacNgaYaaYct
emp P2	PheGlnThrGlnProThrGlyPhe	aaNccIgtNggYtgNgtYtggaa

I : イノシン, R : A or G, Y : C or T, N : A or G or T or C

図 2 5

プライマーナ	オリゴヌクレオチド配列
cmp P3	cctcgtagtgctttggtcgaag
emp P4	accaataccggagtgaaccagca
アダプタープライマー	actatagggcacgcglgg

図 2 6

ctcccatggcttcgctaccccggtgcagtccgtggactgc

図 2 7

atataagcttttagggagagaggacttccatggt

図 2 8

tttctgcaggtaaaatcgaagaaggtaaactggta

図 2 9

aaaaagctttacttggtgatacggactctgcg

図 3 0

ttttggatccgaggagggtgtcgagaaactgttagccac

図 3 1

aaaaagcttctacactggcagctcctcgtctg

図 3 2

aaggatccccgtcatatccggca

図 3 3

aaaagcttttaggcgttatccgcctttagc

図 3 4

tatatccatggcttcttactgccaggcccccttttaa

図 3 5

atataaagcttttatttgatgctctctggccttggaa

図 3 6

atattcatgagcaacgacttgcttcgatccca

図 3 7

atataaagctttcagttctggagataatctgtaagta

SEQUENCE LISTING

<110> Higeta Shoyu Co., Ltd.
 <120> Novel Brevibacillus chosinensis and Producing Method of Protein
 by Using Thereof as Host

<130> 6826

<141> 2004-11-08

<160> 37

<210> 1

<211> 756

<212> DNA

<213> Brevibacillus choshinensis

<400> 1

atgggtgccg atatcaaaaa tgcgagtcaa ccatttctga ccaatgacca agtggaaagat 60
 ttgatagcca agagccaagc tggcgatacg gatgcacgtg agcttctcgtaaatagcaat 120
 atcagactgg tctggtccgt cgtccagcgc ttatcaacc gcgggtatga agcggatgat 180
 ttgtttcaga tcggttgcattggcttgc aaggccgtt acaagttcga tcttcgtac 240
 gatgtgagat ttgcaccta tgcggtgcca atgatcatcg gagaattca acgcttttg 300
 cgcgatgacg gtacggtaa ggtcagtcga tcgttaaaag aaacagcgaa taaggtgcgg 360
 cgatcaaagg atgaatttta caagcaattc ggccgtgccc ccacgatcgc agaagtggca 420
 gaagcagtgg gaatcacgccc ggaggaagta gtcttgcgc aagaggcaag cagagcgcct 480
 tcctccatcc atgagaccgt tttgaaaaat gacggcgatccatcacact gatcgatcag 540
 atagcggatg aagggtgtgaa caagtggttt gagaatttgc cttgaagga cgccatcagc 600
 aggctgagcg agcgtgagca gctcatcgtc tacctgcgtt attacaagga tcagacacag 660
 tctgaggttag cagagcgtctt aggatttcg caggtccagg tctcgcgtctt ggaaaagcgt 720
 atcctgctaa cgatcaagga gcaaattgaa cattag 756

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> Brevibacillus choshinensis

<400> 2

Met Gly Ala Asp Ile Lys Asn Ala Ser Gln Pro Phe Leu Thr Asn Asp

5

10

15

Gln Val Lys Asp Leu Ile Ala Lys Ser Gln Ala Gly Asp Thr Asp Ala

20

25

30

Arg Glu Leu Leu Val Asn Ser Asn Ile Arg Leu Val Trp Ser Val Val

35

40

45

Gln Arg Phe Ile Asn Arg Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Leu Phe Gln Ile

50

55

60

Gly Cys Ile Gly Leu Leu Lys Ala Val Asp Lys Phe Asp Leu Ser Tyr

65

70

75

80

Asp Val Arg Phe Ser Thr Tyr Ala Val Pro Met Ile Ile Gly Glu Ile

	85	90	95
Gln Arg Phe Leu Arg Asp Asp Gly Thr Val Lys Val Ser Arg Ser Leu			
100	105	110	
Lys Glu Thr Ala Asn Lys Val Arg Arg Ser Lys Asp Glu Leu Tyr Lys			
115	120	125	
Gln Phe Gly Arg Ala Pro Thr Ile Ala Glu Val Ala Glu Ala Val Gly			
130	135	140	
Ile Thr Pro Glu Glu Val Val Phe Ala Gln Glu Ala Ser Arg Ala Pro			
145	150	155	160
Ser Ser Ile His Glu Thr Val Phe Glu Asn Asp Gly Asp Pro Ile Thr			
165	170	175	
Leu Ile Asp Gln Ile Ala Asp Glu Gly Val Asn Lys Trp Phe Glu Lys			
180	185	190	
Ile Ala Leu Lys Asp Ala Ile Ser Arg Leu Ser Glu Arg Glu Gln Leu			
195	200	205	
Ile Val Tyr Leu Arg Tyr Tyr Lys Asp Gln Thr Gln Ser Glu Val Ala			
210	215	220	
Glu Arg Leu Gly Ile Ser Gln Val Gln Val Ser Arg Leu Glu Lys Arg			
225	230	235	240
Ile Leu Leu Thr Ile Lys Glu Gln Ile Glu His			
245	250		
<210> 3			
<211> 2265			
<212> DNA			
<213> Brevibacillus choshinensis			
<400> 3			
gtgaacgcag tgaagaaaagg caagaagctt ttatccatcc tattttcttc ctcactggtc	60		
ctgagcggca ttgcggcggt tccagcgaca gggatggcca agtcaaagga caa gcccgg	120		
cttgaagtgg atttgcacatc agtgaacatg gatcggttgg ttaaagcctt gatcgaccaa	180		
ggtgaaatcg acgaggacgc cgaccaggaa gagatcaaca aagctgtgga ga agt ttttgc	240		
agagacaaga aagttccca cggattgtat gactccagct cttcgggaa aaaa gcaagc	300		
aaaacccagc ttccggcagt atcaaaggca gcaagcaaag tatccaagct caa a gatgac	360		
aagcaagtgc gcgcttccaa gcgggtacat acggataatc tggtgattgc cctgggtcgag	420		
ttcaatgatc tggagcaca ccaggtgcca aaacaaagcg attccgttg gacggcagac	480		
ttcgaccaaa agcactacga ggaatgctg ttcgatcgta aaggctatac gactcctgaa	540		
gggataagca tgaccacat ggccaagttac tactacgac aatcggtgaa gacatggacc	600		
gtggatgggg ttgtcactcc gtgggtgact gccgaaaaag ataagaaatt ctacgggtgga	660		
aacatgaaaa acggcaacga tgccaaacccca cgcgatctgg tcgtcgagac actggaaatct	720		
gttagggatg ccatcaaggg tcatgaagaa gaatacgacc aacgcgaccc gta t gacttg	780		
gatggagaca gcgatctgtat ggagccggat ggcgtatcgaa acaacctgtat gctgggttcac	840		
tccggatttg gtgaagagac tgggaaagat gcggatcgatc tctggatctca cgcgtggact	900		

ctgaaaaagc cgacagaaat tccaggcacc agcctgaaag cttacgacta **catgattcag** 960
 cctgaagatg gcgcacccgg cgtattcgca catgaatacg gacacaacct gggactgcca 1020
 gatctgtatg acacgacaag actggacat gattgcggg ttggcgcatg gtcgctgatg 1080
 tttccggaa gccatacagg taagatttc caaaccac caaccggatt tgatccttgg 1140
 tccaaaatga tgctgcagga aatgtatggg gcaagtggta ttgagccgca agtcatcaat 1200
 tacgaagacc tgaaaaaaacg gaaaaaagcag gttcgctct acgatggcag cagcctcgat 1260
 gaagatggca aagtcatcaa gctgaatatg ccgcaagtag agaagacacc gccggttcaa 1320
 ccgaaagacg gcgattattc ttacttctcc gatgagggcg acaatctgaa cacgaagatg 1380
 acttcggaag tgatcgaccc gacaggcgc agtcgcacat cgatgagctt cgactccctgg 1440
 agagcgatcg agaccggta cgactacctg tacgtgaacg tgattgatgt cgactcaggt 1500
 gagagcacaa cagtaaaaga gtacgatgac gaaaccaaag gctggataa ggaagaaatc
 1560
 agcctgaacg atttcgctgg caaaaagatt caagtcgagt tcaactacgt gacggatggc 1620
 ggcttggcga tgtccggctt ctatctggat aatttgcag tcacagcaga cggcgaagta 1680
 gtcttctcgg atgatgcaga aggcgaccag aagtttgcattt tggatggatt catccatttc 1740
 gacggcgaag gcaaaaatgtt cgacgcgtac tacctggtag agctgcgtc ccatgaaggc 1800
 gtggacgagg gtctgaaata cttccgcgc aatgacacat tcttcacgta tgatccaggt 1860
 ctggtgatct ggtactacga tggacgctt ggcaaaacgc aagacaacaa caccagcaac 1920
 catccaggct acggcatgct gggcgtagtc gatgcgcac aggaagttcg ttactggaat 1980
 aacgatgagg gcaacgagga ggccattgcc gactcccggtt accaagtgaa cgatgcggca 2040
 ttcagccga acaaaacctc cggcatggat ctcgactaca ttctcggcac gatggattac 2100
 gagccgctga aaggcattac cgtattcaaa gacagtgtatg attacacgat gccggaagtt 2160
 ccgaaatcg gaaaaatctt gccgaagatc ggtctgcaaa tcaaattaaat **tcgtgtgtcc** 2220
 aagaaattca cgaacgcaca ggtcgagttc tccatcaaaa aataa 2265

<210> 4

<211> 754

<212> PRT

<213> *Brevibacillus choshinensis*

<400> 4

Val Asn Ala Val Lys Lys Gly Lys Lys Leu Leu Ser Ile Leu Phe Ser
 5 10 15

Ser Ser Leu Val Leu Ser Gly Ile Ala Ala Val Pro Ala Thr Gly Met
 20 25 30

Ala Lys Ser Lys Asp Lys Pro Pro Leu Glu Val Asp Leu Ser Thr Val
 35 40 45

Asn Met Asp Arg Leu Val Lys Ala Leu Ile Asp Gln Gly Glu Ile Asp
 50 55 60

Glu Asp Ala Asp Gln Glu Glu Ile Asn Lys Ala Val Glu Lys Phe Leu
 65 70 75 80

Arg Asp Lys Lys Val Pro His Gly Ile Asp Asp Ser Ser Ser Phe Gly
 85 90 95

Lys Lys Ala Ser Lys Thr Gln Leu Ser Ala Val Ser Lys Ala Ala Ser
 100 105 110
 Lys Val Ser Lys Leu Lys Asp Asp Lys Gln Val Arg Ala Ser Lys Arg
 115 120 125
 Val His Thr Asp Asn Leu Val Ile Ala Leu Val Glu Phe Asn Asp Leu
 130 135 140
 Glu His Asn Gln Val Pro Lys Gln Ser Asp Ser Leu Trp Thr Ala Asp
 145 150 155 160
 Phe Asp Gln Lys His Tyr Glu Glu Met Leu Phe Asp Arg Lys Gly Tyr
 165 170 175
 Thr Thr Pro Glu Gly Ile Ser Met Thr Thr Met Ala Lys Tyr Tyr Tyr
 180 185 190
 Glu Gln Ser Gly Glu Thr Trp Thr Val Asp Gly Val Val Thr Pro Trp
 195 200 205
 Leu Thr Ala Glu Lys Asp Lys Lys Phe Tyr Gly Gly Asn Asp Glu Asn
 210 215 220
 Gly Asn Asp Ala Asn Pro Arg Asp Leu Val Val Glu Thr Leu Glu Ser
 225 230 235 240
 Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly His Glu Glu Glu Tyr Asp Gln Arg Asp
 245 250 255
 Pro Tyr Asp Leu Asp Gly Asp Ser Asp Leu Met Glu Pro Asp Gly Met
 260 265 270
 Leu Asp Asn Leu Met Leu Val His Ser Gly Ile Gly Glu Glu Thr Gly
 275 280 285
 Glu Asp Ala Asp Ala Ile Trp Ser His Arg Trp Thr Leu Lys Lys Pro
 290 295 300
 Thr Glu Ile Pro Gly Thr Ser Leu Lys Ala Tyr Asp Tyr Met Ile Gln
 305 310 315 320
 Pro Glu Asp Gly Ala Pro Gly Val Phe Ala His Glu Tyr Gly His Asn
 325 330 335
 Leu Gly Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Thr Thr Arg Leu Gly His Asp Ser
 340 345 350
 Pro Val Gly Ala Trp Ser Leu Met Ser Ser Gly Ser His Thr Gly Lys
 355 360 365
 Ile Phe Gln Thr Gln Pro Thr Gly Phe Asp Pro Trp Ser Lys Met Met
 370 375 380
 Leu Gln Glu Met Tyr Gly Gly Lys Trp Ile Glu Pro Gln Val Ile Asn
 385 390 395 400
 Tyr Glu Asp Leu Lys Lys Arg Lys Lys Gln Ala Ser Leu Tyr Asp Gly
 405 410 415
 Ser Ser Leu Asp Glu Asp Gly Lys Val Ile Lys Leu Asn Met Pro Gln

420	425	430
Val Glu Lys Thr Pro Pro Val Gln Pro Lys Asp Gly Asp Tyr Ser Tyr		
435	440	445
Phe Ser Asp Glu Gly Asp Asn Leu Asn Thr Lys Met Thr Ser Glu Val		
450	455	460
Ile Asp Leu Thr Gly Ala Ser Ser Ala Ser Met Ser Phe Asp Ser Trp		
465	470	475
Arg Ala Ile Glu Thr Gly Tyr Asp Tyr Leu Tyr Val Asn Val Ile Asp		
485	490	495
Val Asp Ser Gly Glu Ser Thr Thr Val Lys Glu Tyr Asp Asp Glu Thr		
500	505	510
Lys Gly Trp Asp Lys Glu Glu Ile Ser Leu Asn Asp Phe Ala Gly Lys		
515	520	525
Lys Ile Gln Val Glu Phe Asn Tyr Val Thr Asp Gly Gly Leu Ala Met		
530	535	540
Ser Gly Phe Tyr Leu Asp Asn Phe Ala Val Thr Ala Asp Gly Glu Val		
545	550	555
Val Phe Ser Asp Asp Ala Glu Gly Asp Gln Lys Phe Asp Leu Asp Gly		
565	570	575
Phe Ile His Phe Asp Gly Glu Gly Lys Met Tyr Asp Ala Tyr Tyr Leu		
580	585	590
Val Glu Leu Arg Ser His Glu Gly Val Asp Glu Gly Leu Lys Tyr Phe		
595	600	605
Arg Arg Asn Asp Thr Phe Phe Thr Tyr Asp Pro Gly Leu Val Ile Trp		
610	615	620
Tyr Tyr Asp Gly Arg Phe Gly Lys Thr Gln Asp Asn Asn Thr Ser Asn		
625	630	635
His Pro Gly Tyr Gly Met Leu Gly Val Val Asp Ala His Gln Glu Val		
645	650	655
Arg Tyr Trp Asn Asn Asp Glu Gly Asn Glu Glu Ala Ile Ala Asp Ser		
660	665	670
Arg Tyr Gln Val Asn Asp Ala Ala Phe Ser Pro Asn Lys Thr Ser Gly		
675	680	685
Met Asp Leu Asp Tyr Ile Leu Gly Thr Met Asp Tyr Glu Pro Leu Lys		
690	695	700
Gly Ile Thr Val Phe Lys Asp Ser Asp Asp Tyr Thr Met Pro Glu Val		
705	710	715
Pro Glu Ile Gly Lys Ile Leu Pro Lys Ile Gly Leu Gln Ile Lys Leu		
725	730	735
Ile Arg Val Ser Lys Lys Phe Thr Asn Ala Gln Val Glu Phe Ser Ile		
740	745	750

Lys Lys

754

<210> 5

<211> 1362

<212> DNA

<213> *Brevibacillus choshinensis*

<400> 5

atgaaccatc ctgattttcg cgatctaccc gcctgcattgg aagacgttaac cctcgctgcc 60
 ctggacgagt acactggtcc accagatccg accgaataacc aatcatttgc tggacgcttg 120
 caagagggtt ccgaaactct ccctccgctc tatcgggagc atgtgtatca ccctttctt 180
 caagcgatgg acaagttgtc tgagttagga ttgcgcaga tgctccgtcg agatcctcaa 240
 aaagagcgag aagccggctt gtttgcgt atcgcacagg ccattctgca aaacggcgaa 300
 gcgtatgaac gcgtatgccc acggatccctt caggaagtag tcagcgattt gtacgacggt 360
 ttttaagcg aggaagacag gagtggcatc aaaccgcctg atgaaagctt gattgctcct 420
 ctggtcaaattt ggggacgccc gcaattcgga ccttatacgt ggacagctga agccgctgcc 480
 cattttggca tcaagacggg cattgtcaat ttgcggccgg caaacgccc cctgggtctg 540
 ctcgcgtgg ctgcatttagg tcacgaaaacg gtcggacacg acattctcca cgccgacacc 600
 gttttgcgtt gagaactgca gcaaaaccgtc tatgacgcctt tgtttgcgtt gcttcacaat 660
 cggacgctgg cggactactg gtcgcctccga atcgacgaga ctgcctccga cgttttggaa 720
 atcctgaaca cggccccgc tgcaaggattt ggactgattt gatatttccg cggcccttaat 780
 aaggcgtaca cggacaaggc aacactgcgg aatacaggc cacagaatga cccacatcca 840
 gcagacatct tgccgcgttta tttgcgtctt gagaactgctc gtctgcgtca tttgcacaac 900
 gcatccgact gggcacaggc acttctcgag gaaaccaggc gtgtatctaa aggcatacaca 960
 ataggcagag ctccttttgc tgcagaaaacc gctcaaaaat ctgcgtccat tgcgtctgc 1020
 acaattatgg aagcacccct gtcagtctg gaaggtcatg ccctcggc aattcaaaaac 1080
 tggcacaacg aggtatgaaacg aatcggtttag gaaattcgct cccattttac aggttccctg 1140
 accgtcaag acggcattgt ttccggatgt tatgcgtccgc atgtcggttgc agcagccgtc 1200
 caagcagccg ttccggatgtt gatggatacc tccgcgtcc tcacaggat gaaaaccttg 1260
 ctgaagagca tgcaacgcgc caatccctcc tggggacccctc tctatgtacg atatcgccgt 1320
 gatctcactc cgcatcgcat ttactccgt tctgcgtt ag 1362

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> *Brevibacillus choshinensis*

<400> 6

Met Asn His Pro Asp Phe Arg Asp Leu Pro Ala Cys Met Glu Asp Val

5

10

15

Thr Leu Ala Ala Leu Asp Glu Tyr Thr Gly Pro Pro Asp Pro Thr Glu

20

25

30

Tyr Gln Ser Leu Tyr Gly Arg Leu Gln Glu Val Ala Glu Thr Leu Pro

35

40

45

Pro Leu Tyr Arg Glu His Val Tyr His Pro Phe Leu Gln Ala Met Asp
 50 55 60
 Lys Leu Ser Glu Ser Gly Phe Ala Gln Met Leu Arg Arg Asp Pro Gln
 65 70 75 80
 Lys Glu Arg Glu Ala Gly Leu Phe Cys Asp Ile Ala Gln Ala Ile Leu
 85 90 95
 Gln Asn Gly Glu Ala Tyr Glu Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 100 105 110
 Val Val Ser Asp Leu Tyr Asp Gly Phe Leu Ser Glu Glu Asp Arg Ser
 115 120 125
 Gly Ile Lys Pro Pro Asp Glu Ser Leu Ile Ala Pro Leu Val Lys Trp
 130 135 140
 Gly Arg Pro Gln Phe Gly Pro Tyr Thr Trp Thr Ala Glu Ala Ala Ala
 145 150 155 160
 His Phe Gly Ile Lys Thr Gly Ile Val Asn Leu Pro Pro Ala Asn Ala
 165 170 175
 Arg Leu Gly Leu Leu Ala Trp Ser Ala Leu Gly His Glu Thr Ala Gly
 180 185 190
 His Asp Ile Leu His Ala Asp Thr Gly Leu Leu Gly Glu Leu Gln Gln
 195 200 205
 Thr Val Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Glu Leu His Asn Arg Thr Leu Ala
 210 215 220
 Asp Tyr Trp Ser Leu Arg Ile Asp Glu Thr Ala Ser Asp Val Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Asn Thr Gly Pro Ala Ala Gly Ile Gly Leu Ile Gly Tyr Phe
 245 250 255
 Arg Gly Leu Asn Lys Ala Tyr Thr Gly Gln Ala Thr Leu Arg Asn Thr
 260 265 270
 Gly Pro Gln Asn Asp Pro His Pro Ala Asp Ile Leu Arg Gly Tyr Leu
 275 280 285
 Ala Ala Glu Thr Ala Arg Leu Leu His Phe Asp Asn Ala Ser Asp Trp
 290 295 300
 Ala Gln Ala Leu Leu Glu Glu Thr Arg Arg Asp Leu Lys Gly Ile Thr
 305 310 315 320
 Ile Gly Arg Ala Ser Leu Asp Ala Glu Thr Ala Gln Lys Ser Ala Ala
 325 330 335
 Ile Val Ala Arg Thr Ile Met Glu Ala Arg Leu Leu Ser Leu Glu Gly
 340 345 350
 His Ala Leu Gly Gln Ile Gln Asn Trp His Asn Glu Asp Glu Arg Ile
 355 360 365
 Val Gln Glu Ile Arg Ser His Phe Thr Gly Ser Leu Thr Val Gln Asp

370	375	380	
Gly Ile Val Ser Gly Met Tyr Ala Ala His Val Val Ala Ala Ala Val			
385	390	395	400
Gln Ala Ala Val Ser Gly Glu Met Asp Thr Ser Ala Ala Phe Thr Gly			
405	410	415	
Met Lys Thr Leu Leu Lys Ser Met His Asp Ala Asn Pro Ser Trp Gly			
420	425	430	
Pro Leu Tyr Val Arg Tyr Arg Gly Asp Leu Thr Pro His Arg Ile Tyr			
435	440	445	
Ser Arg Ser Ala Ser			
450	452		
<210> 7			
<211> 28			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<400> 7			
gggggtaccc cactctgtca gcatgctg			
<210> 8			
<211> 27			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<400> 8			
gggggatccc ggcgtgattc ccactgc			
<210> 9			
<211> 27			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<400> 9			
gggctgcaga tagcggatga aggtgtg			
<210> 10			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<400> 10			
gggtctagac ctgcttatac atctgtttcg			
<210> 11			
<211> 39			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<400> 11			
gagagaccat ggaccatcct gatttcgcg atctacccg			

<210> 12
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 12
agaattcagt ggtgggtgg gtgggtgg tggctgcag aacgggagta aatgcgatgc 60
<210> 13
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 13
aaaagaattc ttctgcaga acaggatgcg ggggagccgc cgct 44
<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 14
aaaaaggatc ttatagcat ctaatttca acaaact 37
<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 15
aaaaaaaagat cttgaacgat gacctataat aattgttaa 39
<210> 16
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 16
aaaagaattc aatctagaa agtgtgtgct ctgcgaggct gtc 43
<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 17
tccatggcac aatttggtat attatgtaaa 30
<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 18

actcgagttatgcgtcta tttatgtagg at	32
<210> 19	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 19	
tttttcttag actttatgaa tataaagtat agtgtgt	37
<210> 20	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 20	
gggggctgca gttatatgcg tctattatg taggatg	37
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 21	
aarcgngtnc ayacngayaa yct	23
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 22	
aanccngtng gytgngtytg gaa	23
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 23	
cctcgtagtg cttttggtcg aag	23
<210> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 24	
accaataccg gagtgaacca gca	23
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<400> 25	
actataggc acgcgtgg	19
<210> 26	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 26	
ctccatggc ttgcgtacc cccgtgcagt ccgtggactg c	41
<210> 27	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 27	
atataagctt ttagggagag aggacttcca tggt	34
<210> 28	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 28	
tttgcagg taaaatcgaa gaaggtaaac tggta	35
<210> 29	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 29	
aaaaagctt tacttgtga tacgagtctg cgcg	34
<210> 30	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 30	
tttggatcc gaggagggtgt cggagaactg tagccac	37
<210> 31	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 31	
aaaaagcttc tacactggca gtcctcctg tctg	34
<210> 32	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<400> 32	
aaggatcccc gtcatatccg gca	23
<210> 33	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 33	
aaaagcttta ggcgttatcc gctttagc	28
<210> 34	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 34	
tatatccatg gcttcttact gccaggcgcc ctttttaa	39
<210> 35	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 35	
atataagctt ttattttgtat gctctctggc ctggaa	37
<210> 36	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 36	
atattcatga gcaacgactt gcttcgatcc ca	32
<210> 37	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 37	
atataagctt tcagttctgg agataatctg taagta	36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016912

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N1/20, 15/01, C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/20, 15/01, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-509096 A (Novo Nordisk A/S), 17 August, 1999 (17.08.99), Full text & WO 97/03185 A1 & US 837925 A	1-12, 14-16
Y	WO 2003/006649 A2 (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE IN HER MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND), 23 January, 2003 (23.01.03), Full text & EP 1407054 A2 & JP 2004-534545 A	1-12, 14-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28 January, 2005 (28.01.05)Date of mailing of the international search report
15 February, 2005 (15.02.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016912

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-514236 A (Institut Pastool), 07 December, 1999 (07.12.99), Full text & WO 97/15677 A2 & US 6096306 A & EP 861328 A2	1-12, 14-16
A	JP 4-287686 A (ENIRICERCHE S.p.A), 13 October, 1992 (13.10.92), Full text & EP 492274 A2 & US 6284490 A	1-16
A	JP 2002-142776 A (Higeta Shoyu Co., Ltd.), 21 May, 2002 (21.05.02), Full text (Family: none)	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N1/20, 15/01, C12P21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N1/20, 15/01, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 11-509096 A (ノボ ノルディスク アクティー ゼルスカブ) 1999. 08. 17, 全文 & WO 97/03 185 A1 & US 837925 A	1-12, 1 4-16
Y	WO 2003/006649 A2 (THE SECRETAR Y OF STATE FOR DEFENCE IN HER MAJESTY'S GOVERMENT OF THE UNI TED KINGDOM OF GREAT BRITAIN A ND NORTHERN IRELAND) 2003. 01. 2 3, 全文 & EP 1407054 A2 & JP 2004	1-12, 1 4-16

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 01. 2005

国際調査報告の発送日

15. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4B 9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
	- 5 3 4 5 4 5 A	
Y	JP 11-514236 A (アンスティテュ、パストゥール) 1999. 12. 07, 全文 & WO 97/15677 A2 & US 6096306 A & EP 861328 A2	1-12, 1 4-16
A	JP 4-287686 A (エニリチエルヘ・ソシエタ・ペル・ アチオニ) 1992. 10. 13, 全文 & EP 492274 A2 & US 6284490 A	1-16
A	JP 2002-142776 A (ヒゲタ醤油株式会社) 200 2. 05. 21, 全文 (ファミリーなし)	1-16